

THÈSE EN COTUTELLE

Présentée

à l'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Mention : Chimie-Physique

à l'UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Pour obtenir le titre de

PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph. D.)

Par

Bertrand Brizet

Maître ès Sciences

**Synthèse et étude de nouveaux précurseurs pour une
imagerie bimodale optique/TEP ou TEMP**

Soutenue le 24 avril 2014 devant la commission d'examen

Raymond ZIESSEL	Directeur de recherche au CNRS, Strasbourg	Rapporteur
Eric BENOIST	Professeur à l'Université de Toulouse	Rapporteur
Christine GOZE	Maître de Conférence à l'Université de Bourgogne	Examinateur
Yue ZHAO	Professeur à l'Université de Sherbrooke	Examinateur
Pierre D. HARVEY	Professeur à l'Université de Sherbrooke	Co-directeur
Franck DENAT	Professeur à l'Université de Bourgogne	Co-directeur

**SYNTHÈSE ET ETUDE DE NOUVEAUX PRÉCURSEURS
POUR UNE IMAGERIE BIMODALE OPTIQUE/TEP ou TEMP**

Par

Bertrand Brizet

Thèse en cotutelle présentée

au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de Philosophiæ doctor (Ph. D.)
FACULTÉ DES SCIENCES, UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

à la Faculté des Sciences et des Techniques en vue
de l'obtention du grade de Docteur
UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

Avril 2014

Le 24 avril 2014

*le jury a accepté la thèse de monsieur Bertrand Brizet
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Raymond Ziessel
Directeur de recherche au CNRS, Université de Strasbourg
Rapporteur

Professeur Eric Benoist
Université de Toulouse
Rapporteur

Docteur Christine Goze
Université de Bourgogne
Évaluateur

Professeur Yue Zhao
Université de Sherbrooke
Évaluateur interne

Professeur P. D. Harvey
Université de Sherbrooke
Co-directeur

Professeur Franck Denat
Université de Bourgogne
Co-directeur

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse, réalisé au sein de l'Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne et de la Faculté des Sciences de l'Université de Sherbrooke s'est déroulé sous la direction des Professeurs Franck Denat et Pierre D. Harvey. Je vous suis très reconnaissant de m'avoir chaleureusement accueilli dans vos laboratoires respectifs et de m'avoir fait confiance au cours de ces années de doctorat. Je garde d'excellents souvenirs de mes séjours passés en France comme au Québec. Si c'était à refaire, ce serait sans hésiter!

Je remercie les Professeurs Eric Benoist et Yue Zhao qui ont accepté de faire partie du jury de thèse, ainsi que le Professeur Raymond Ziessel qui m'a fait l'honneur de le présider. J'ai apprécié vos remarques constructives, tant sur le manuscrit que sur la soutenance de thèse. Une petite pensée au Professeur Gessie Brissard également qui n'a malheureusement pas pu faire partie du jury, comme c'était initialement prévu.

Un TRÈS grand merci à Christine Goze, qui m'a orienté et conseillé tout au long de mon stage de Master et de mon doctorat. Ton soutien permanent (en France comme au Québec) a beaucoup compté pour moi. Je n'oublierai pas ton enthousiasme et ta bonne humeur quotidienne, j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi!

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de réaliser mes enseignements à Dijon comme à Sherbrooke, en particulier Claire-Hélène et Laurent Brachais, Jérôme Bayardon ainsi que Régina Zamojska et Gessie Brissard. J'ai beaucoup appris de vous et de ces heures passées avec les étudiants.

Merci à toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à ce travail de thèse : Anthony Romieu (bibliographie bien fraîche), Victor (purification HPLC, et biblio fraîche aussi), Yulia Volkova, Antoine Eggenpiller et Nicolas Desbois pour la synthèse, Claude Gros (collaborations), Marie Jo et Fanny (spectrométrie de masse), Christine Stern et Alain Tabard (informatique), Mathieu (informatique aussi...), Shawkat Ali et Anthony Lapprand (photophysique), Michel Meyer (Fluorimètre), Philippe Richard, Adam et Antoine (calculs DFT), Yoann Rousselin (cristallographie). Merci également à Jean-Marc Chapuzet qui m'a beaucoup aidé pour les multiples démarches administratives québécoises, et qui m'a aussi renseigné sur les multiples techniques de chasse qu'il pratique, bien que ça n'aie aucun rapport avec la chimie.

Avant d'attaquer la partie un peu plus fun de ces remerciements, j'adresse un tendre merci à Marc Pirrota pour tous les bons moments passés au laboratoire en ta compagnie: la pureté des BODIPY que tu as synthétisés pour le laboratoire n'a d'égal que ta classe et ton raffinement! Je retiendrai plusieurs choses de toi, parmi lesquelles ton rire très communicatif, et certaines de tes blagues inénarrables.

Puisque j'ai presque épuisé mon répertoire de formule de remerciements, j'énumérerai un peu dans le désordre toutes les personnes que j'associe aux bons moments passés aux cours de ma thèse. Certains d'entre eux se sont appropriés d'étranges surnoms, c'est le cas notamment des trois indissociables mousquetaires alias Biquet, la Mouche et la Burne (on se demande encore lequel est le pire...). Ajoutons Spot, Mr Paulin, Marie-Jo, Paulette, Semra la frangine, Mylène, la Bûche, Frück, Stéphane la Marte, la Spiele, Adrien et la Fougasse; les anciens du R13 : Nicolas Sok, La maindre, Yulia, Aline Nonat, Sarah Pegaz ; les anciens du Master, en particulier Margot, Mathieu, Vincent, Loïc et Khaled ; les collègues et amis du Québec, Hugo, Jo et Martin, Arnaud, Antoine Bonnot, Simon le Hobbit, Sarah Choopy, Tom la grand-mère et Loïc alias Princesse Kilo. Ca a toujours été un plaisir de venir travailler au labo, et c'est en grande partie grâce à vous!

Je pense également à ma famille, notamment ma grand-mère, mes parents et ma soeur qui m'ont soutenu durant toutes mes études. Mes amis, à Dijon comme à Sherbrooke, ont également beaucoup compté pour moi. Manu par exemple, ma coloc de choc dont je tairai le surnom, a très bien su gérer le stress du doctorant en rédaction.

Avant de terminer, j'adresse un dernier cui-cui à Claire Bernhard et Mathieu Moreau (alias la Morue) qui sont un peu les deux dinosaures du R13 et qui ont beaucoup compté pour moi durant toutes ces années. Vous m'avez soutenu depuis mon arrivée au laboratoire jusqu'à ma soutenance de thèse, et je ne l'oublierai pas. Les moments passés avec vous au laboratoire, et en dehors, sont inoubliables. Gros kiss à tous les deux.

Je terminerai finalement par une citation pour laquelle j'associerai google à cette avalanche de remerciements :

"Quand tu es arrivé au sommet de la montagne, continue de grimper"

Proverbe chinois.

SOMMAIRE

NOTATIONS ET ABREVIATIONS	9
----------------------------------	----------

INTRODUCTION	13
---------------------	-----------

1 L'IMAGERIE OPTIQUE PAR FLUORESCENCE	15
1.1 UTILISATION DE LA FLUORESCENCE EN MILIEU BIOLOGIQUE	18
1.1.1 La fluorescence : aspects théoriques	18
1.1.2 Limites de l'imagerie optique par fluorescence	22
1.2 METHODES D'IMAGERIE PAR FLUORESCENCE	29
1.2.1 L'imagerie de fluorescence par réflexion	30
1.2.2 Microscopie par fluorescence	32
1.2.3 La tomographie moléculaire de fluorescence	35
2 MARQUEURS FLUORESCENTS POUR LA DETECTION DES TUMEURS	38
2.1 CAHIER DES CHARGES POUR LES MARQUEURS FLUORESCENTS UTILISES EN IMAGERIE	38
2.1.1 Propriétés photophysiques	38
2.1.2 Propriétés physico-chimiques	39
2.1.3 Propriétés pharmacocinétiques	40
2.2 FLUOROPHORES ORGANIQUES NIR POUR L'IMAGERIE IN VIVO.	41
2.2.1 Les cyanines	41
2.2.2 Les squaraines	42
2.2.3 Les xanthènes	43
2.2.4 Porphyrines et phtalocyanines	45
2.2.5 Les BODIPY	48
2.3 VECTORISATION DES FLUOROPHORES	52
2.3.1 Accumulation de certains composés dans les tumeurs	52
2.3.2 Les peptides pour cibler les tumeurs	54
2.3.3 Fonctions de greffage pour la bioconjugaison	55
3 VERS UNE IMAGERIE BIMODALE OPTIQUE ET NUCLEAIRE	59
3.1 GENERALITES SUR L'IMAGERIE NUCLEAIRE.	59
3.2 APPORTS DE LA BIMODALITE OPTIQUE ET NUCLEAIRE	63
3.2.1 Applications cliniques et pré-cliniques.	64
3.2.2 Les agents bimodaux optique/TEP ou TEMP	67

CHAPITRE II ELABORATION DE NOUVEAUX PRECURSEURS POUR L'IMAGERIE BIMODALE OPTIQUE/TEP	75
---	-----------

1 FONCTIONNALISATION DE L'ATOME DE BORE DE BODIPY PAR DIVERS GROUPEMENTS ALCOXY OU ARYLOXY	77
1.1 INTRODUCTION A L'ARTICLE I.	77
1.1.1 Fonctionnalisation de l'atome de bore des BODIPY.	77
1.1.2 Objectifs	80
1.2 ARTICLE I	81
1.3 DONNEES SUPPLEMENTAIRES	102
1.3.1 Essais pour introduire un macrocycle sur un BODIPY par <i>O</i> -fonctionnalisation.	102
1.3.2 <i>O</i> -BODIPY dissymétriques.	104
1.4 CONCLUSION	105
2 NOUVEAUX SYNTHONS BODIPY-DMAP POUR L'IMAGERIE BIMODALE OPTIQUE/TEP	107
2.1 INTRODUCTION A L'ARTICLE II	107
2.1.1 Revue de littérature concernant les [¹⁸ F]BODIPY	107
2.1.2 Objectifs	112

2.2	ARTICLE II	114
2.3	DONNEES SUPPLEMENTAIRES	145
2.3.1	Test d'introduction d'une fonction isothiocyanate sur un BODIPY-DMAP distyryle.	145
2.3.2	Perspectives : vers des agents bimodaux optique/TEP multivalents.	147
2.3.3	Stratégie envisagée pour améliorer l'hydrosolubilité des BODIPY styryle.	148
2.4	CONCLUSION	154
3	CONCLUSION DU CHAPITRE II	157

CHAPITRE III TRANSFERTS D'ENERGIE DANS LES SYSTEMES BICHROMOPHORQUES A BASE DE BODIPY

1	LE TRANSFERT D'ENERGIE PHOTOINDUIT	161
1.1	DEFINITION	162
1.1.1	Distinction entre transfert d'énergie radiatif et non radiatif.	162
1.1.2	Transfert d'énergie non radiatif.	163
1.2	APPLICATIONS	166
2	TRIADES O-BODIPY-BISPORPHYRINE : CARACTERISATION DE L'EFFET D'ANTENNE	169
2.1	INTRODUCTION	169
2.2	ARTICLE III	171
2.3	DISCUSSION GENERALE	185
3	TRANSFERT D'ENERGIE DANS DES SYSTEMES BODIPY-CORROLE	187
3.1	INTRODUCTION	187
3.1.1	Généralités sur les corroles	187
3.1.2	Systèmes multichromophoriques à base de corrole pour le transfert d'énergie	188
3.2	ARTICLE IV	192
3.3	DISCUSSION GENERALE	220
4	CONCLUSION DU CHAPITRE III	223

CONCLUSION GENERALE

EXPERIMENTAL SECTION

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

ANNEXE 1 : PROPRIÉTÉS DE RÉFRACTION, DE DIFFUSION ET D'AUTOFLUORESCENCE DES TISSUS	253
ANNEXE 2 : "SUPPORTING INFORMATION" DE L'ARTICLE I	257
ANNEXE 3 : "SUPPORTING INFORMATION" DE L'ARTICLE II	285
ANNEXE 4 : "SUPPORTING INFORMATION" DE L'ARTICLE III	325
ANNEXE 5 : "SUPPORTING INFORMATION" DE L'ARTICLE IV	343

COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

NOTATIONS ET ABRÉVIATIONS

AND(P)H: reduced nicotamide adenine dinucleotide phosphate
AMM: Autorisation de Mise sur le Marché
Arg: Arginine
Asp: Asparagine
BBN: Bombesine
BLI : BioLuminescence Imaging
CCK : CholeCystoKinin
CI : Conversion Interne
CIS : Croisement InterSystème
CT: Computerized Tomography
DFT : Density Functional Theory
DMF : Dimethyformamide
DMSO : Dimethylsulfoxide
DOT: Diffuse Optical Tomography
DOTA : 2,2',2'',2'''-(1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrayl)tetraacetic acid
DMAP : *N,N*-DiMethylAminoPyridine
DTPA : 2,2',2'',2'''-((((carboxymethyl)azanediyl)bis(ethane2,1diyl))bis(azanetriyl))tetraacetic acid
EDCI : 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
ESI : Electrospray Ionisation
Et : Ethyle
EPR : Enhanced Permeability and Retention
FAD : Flavin Adenine Dinucleotide
FDG : FluoroDesoxyGlucose
fDOT: Fluorescence Diffuse Optical Tomography
FITC : Fluorescein IsoThioCyanate
FMT : Fluorescence Mediated Tomography
FRET : Förster Resonance Energy Transfer
FRI : Fluorescence Reflectance Imaging
GFP: Green Fluorescent Protein
Gly: Glycine
Hb : Hemoglobin
HbO₂: OxyHemoglobin
HER : HERceptin Receptor
HOBt : 4-Hydroxybenzotriazole
HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC : High-Performance Liquid Chromatography
ICT : Intramolecular Charge Transfer

IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
IVM : IntraVital Microscopy
LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight
Me : Méthyle
MOMIA: MOnomolecular Multimodality Imaging Agents
MSAP : Multifunctionnal Single-Attachment Point
NaBH₄ : Borohydrure de sodium
NADH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide
NIR: Near Infra-Red
NT: Neurotensine
OC: Octreotide
OCT: Optical Coherence Tomography
PAI : PhotoAcoustic Imaging
PBS : Phosphate Buffer Solution
PDT: PhotoDynamic Therapy
PEG: PolyEthylene Glycol
PET: Positron Emission Tomography
PSMA : Prostate Specific Membrane Antigen
RET : Resonance Energy Transfer
RGD: Arg-Gly-Asp
RV : Relaxation Vibrationelle
SERS : Surface-Enhanced Raman Scattering
SPECT: Single Photon Emitted Computed Tomography
SPIO : SuperParamagnetic Iron Oxyde
SSTR : SomatoSTatin Receptor
TEMP : Tomographie d'Emission MonoPhotonique
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TFA : TriFluoroacetic Acid
TLC : Thin Layer Chromatography
TMSOTf : Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
TOC : Tyr-Octreotide
TR-DOT: Time-Resolved Diffuse Optical Tomography
Tyr : Tyrosine
USPIO : Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxyde
UV : Ultra-Violet
VIP: Vasoactive Intestinal Peptide

INTRODUCTION

L'imagerie médicale regroupe les moyens d'acquisition et de restitution d'images qui permettent de visualiser indirectement l'anatomie, la physiologie et le métabolisme du corps humain en créant une représentation visuelle d'une zone ciblée. C'est aujourd'hui un outil incontournable dans le diagnostic et le traitement de différentes pathologies. L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), le scanner (CT pour computerized tomography), et l'échographie sont des méthodes qui ont largement fait leurs preuves dans le domaine de l'imagerie dite anatomique ou structurale, qui permettent d'obtenir des informations sur la structure des organes. Ces méthodes d'imagerie ont cependant leurs limites car elles ne permettent pas de visualiser des processus à l'échelle cellulaire et moléculaire. Certaines pathologies, notamment le cancer, se manifestent d'abord par des changements biochimiques, et non morphologiques. Ce sont les méthodes d'imagerie moléculaire (ou imagerie fonctionnelle) qui permettent de répondre à cette problématique.¹ Elles requièrent généralement l'utilisation de traceurs vectorisés vis-à-vis d'une zone d'intérêt. Parmi les méthodes d'imagerie fonctionnelle, les techniques d'imagerie nucléaire (tomographie par émission de positons, TEP et tomoscintigraphie par émission monophotonique, TEMP) sont les plus couramment utilisées,² il faut citer également certaines études IRM.³ L'imagerie optique par fluorescence est une méthode d'imagerie fonctionnelle récente, en plein développement. Sa grande sensibilité et le fait de pouvoir obtenir des images bien résolues en quasi-temps réel en font une modalité d'imagerie très prometteuse, tant au stade clinique que pré-clinique.⁴

L'utilisation simultanée de plusieurs méthodes d'imagerie, appelée multimodalité, est une approche en plein développement. Elle permet de cumuler certains avantages inhérents à chacune des techniques et d'accéder à des informations uniques, permettant de rendre le diagnostic plus précis. Les combinaisons TEP/CT et SPECT/CT, par exemple sont couramment utilisées dans les centres hospitaliers, tandis que des associations TEP/IRM, optique/IRM, optique/TEMP ou optique/TEP sont actuellement à l'étude. Bien que la plupart des examens multimodaux consistent actuellement en l'injection simultanée de plusieurs traceurs, de nombreuses équipes de recherche développent de nouveaux agents d'imagerie multimodaux. L'utilisation de ces molécules permettant de réaliser simultanément plusieurs examens d'imagerie limite la toxicité et les problèmes de différence de biodistribution rencontrés lors de l'utilisation de plusieurs marqueurs. Ce travail de thèse s'inscrit dans le processus de développement d'agents d'imagerie optique/TEMP ou optique/TEP.

Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse en cotutelle entre l'Université de Bourgogne et l'Université de Sherbrooke vise deux objectifs :

Élaboration de traceurs adaptés à l'imagerie bimodale optique et nucléaire. Ce travail de synthèse est réalisé à l'Université de Bourgogne. L'objectif est d'élaborer de nouvelles méthodes de radiomarquage d'un fluorophore de type BODIPY, et de le lier à une biomolécule ayant une forte affinité vis-à-vis d'une zone d'intérêt. Des travaux d'optimisation des propriétés du BODIPY sont également présentés dans ce manuscrit : hydrosolubilisation du fluorophore et décalage de ses longueurs d'onde d'absorption et d'émission dans le proche infra-rouge.

Caractérisations photophysiques des composés élaborés. Ce travail est réalisé à l'Université de Sherbrooke. Il permet d'étudier les propriétés luminescentes des BODIPY synthétisés à Dijon, et de connaître l'influence sur ces propriétés des différentes post-fonctionnalisations effectuées. Des études photophysiques plus poussées portant sur l'effet d'antenne de systèmes multichromophoriques à base de BODIPY élaborés à Dijon sont également réalisées en parallèle à ces travaux. Cette partie sera présentée dans le Chapitre III.

1 L'imagerie optique par fluorescence

L'imagerie optique désigne l'ensemble des méthodes permettant de construire des images à partir de la détection de photons. Elle a longtemps souffert de l'ombre créée par le développement de techniques d'imagerie très performantes et bien implantées dans les hôpitaux. La radiologie a su s'imposer dès le début du XX^e siècle comme un outil efficace. Elle a été suivie dans les années 1950 par l'essor de l'échographie. Les années 1970 ont connu le boom de l'imagerie : début du scanner (CT pour Computerized Tomography), de l'IRM, mise en place de la médecine nucléaire marquant le début de l'imagerie fonctionnelle. Ces différentes techniques ont su démontrer leur intérêt médical et se sont progressivement imposées dans la communauté médicale comme des outils de diagnostic incontournables. La seconde piste permettant d'expliquer l'émergence tardive des méthodes optiques dans le monde de l'imagerie tient à la réponse physique des tissus biologiques lorsqu'ils sont éclairés : ils absorbent et diffusent le rayonnement, ce qui limite la profondeur d'observation. Ces deux raisons expliquent en grande partie les limitations de l'utilisation de la lumière visible dans le domaine de l'imagerie médicale. Cependant, à compter des années 90, et avec le développement de l'imagerie fonctionnelle, l'imagerie optique, et plus particulièrement l'imagerie optique par fluorescence connaît un regain d'intérêt. Ces méthodes utilisent un agent fluorescent et possèdent des caractéristiques uniques qui les démarquent des méthodes d'imagerie traditionnelles (cf Tableau 1).

Contrairement à l'imagerie par rayons X ou nucléaire, l'imagerie optique est non-ionisante. Les examens peuvent donc être répétés sans risque pour le patient et pour le médecin. Ils sont relativement faciles à mettre en oeuvre puisqu'ils ne nécessitent pas de protection particulière pour protéger la zone d'examen de rayons ionisants. Les rayons ionisants présentent aussi le risque d'interférer avec la zone d'intérêt et d'influer sur les processus physiologiques à étudier. De ce point de vue, l'imagerie optique est plus "transparente", bien que l'utilisation d'un agent de contraste peut également, dans une certaine mesure, avoir une influence sur la zone à étudier. Cet aspect sera abordé plus en détail dans la partie 2.1

Le second avantage notable de l'imagerie optique est son excellente résolution temporelle. Des images en quasi-temps réel peuvent être obtenues. En comparaison, l'IRM qui est limitée par sa sensibilité nécessitera un temps d'acquisition plus long pour obtenir une image bien définie. Cette particularité est un atout important en imagerie fonctionnelle, les processus biochimiques à étudier se déroulant parfois à l'échelle de la seconde.

Finalement, l'imagerie optique est une méthode relativement accessible, en comparaison aux méthodes d'imagerie classiques. L'appareillage classique pour un examen d'imagerie optique est constitué d'un détecteur photonique, une caméra CCD

(Charged Coupled Device) le plus souvent, et d'une source d'excitation (laser ou source continue).

Tableau 1 : Caractéristiques des principales méthodes d'imagerie in vivo.^{5,6}

Modalité	Agent de contraste	Résolution temporelle	Résolution spatiale	Sensibilité (mol.L ⁻¹)	Profondeur	Coût	Toxicité
Tomodensitométrie (CT)	Iode	min	50-200 µm	-	Sans limite	\$	Rayons ionisants
Imagerie par résonance magnétique (IRM)	Chélates de Gd, SPiO, USPIO	min-h	10-100 µm	10 ⁻³ 10 ⁻⁵	Sans limite	\$\$\$	Agent de contraste
Tomographie par émission de positons (TEP)	Emetteurs de positons	sec-min	1-2 mm	10 ⁻¹¹ à 10 ⁻¹²	Sans limite	\$\$\$	Rayons ionisants
Tomographie d'émission monophotonique (TEMP)	Emetteurs de rayons γ	min	1-2 mm	10 ⁻¹⁰ à 10 ⁻¹¹	Sans limite	\$	Rayons ionisants
Ultrasons haute fréquence	Microbulles	sec-min	10-100 µm	10 ⁻¹²	mm-cm	\$	Aucune
Imagerie de diffusion Raman exaltée en surface (SERS)	Nanoparticules	min-jour	1 mm	10 ⁻¹² à 10 ⁻¹⁵	5 mm	-	Agent de contraste
Imagerie photoacoustique (PAI)	Nanoparticules Fluorochromes	sec-min	10 µm à 1 mm	-	6 mm à 5 cm	\$	Agent de contraste
Imagerie optique par bioluminescence (BLI)	Fluorophore endogène	sec-min	3-5 mm	10 ⁻¹⁵ à 10 ⁻¹⁷	1-2 cm	\$	Faible
Imagerie de fluorescence par réflexion (FRI)	Fluorophores Photoprotéines	sec	1 mm	10 ⁻⁹ à 10 ⁻¹²	< 1 cm	\$	Agent de contraste
Tomographie de fluorescence (FMT)	Fluorophore Infrarouge	min	1 mm	10 ⁻⁹ à 10 ⁻¹²	2-3 cm	\$	Agent de contraste
Microscopie intravitale (IVM)	Fluorophores Photoprotéines	sec-h	1 µm	10 ⁻¹⁵ à 10 ⁻¹⁷	400-800 µm	\$	Agent de contraste

Organisation de la première partie de l'introduction :

Tout d'abord, nous introduirons des notions théoriques sur l'émission de fluorescence, puis nous décrirons les limites liées à l'utilisation de la fluorescence *in vivo*, notamment l'interaction de la lumière avec les tissus biologiques, et avec le fluorophore. La fin de cette première partie sera consacrée aux différentes techniques d'imagerie optique par fluorescence et leurs applications en imagerie clinique et préclinique.

1.1 Utilisation de la fluorescence en milieu biologique

1.1.1 La fluorescence : aspects théoriques

La fluorescence est définie comme la propriété que possèdent certaines molécules appelées fluorophores à absorber la lumière et à la réémettre sous forme de rayonnements de même ou plus basse énergie. Elle fait partie d'un ensemble de processus photophysiques qui sont représentés dans le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 1).

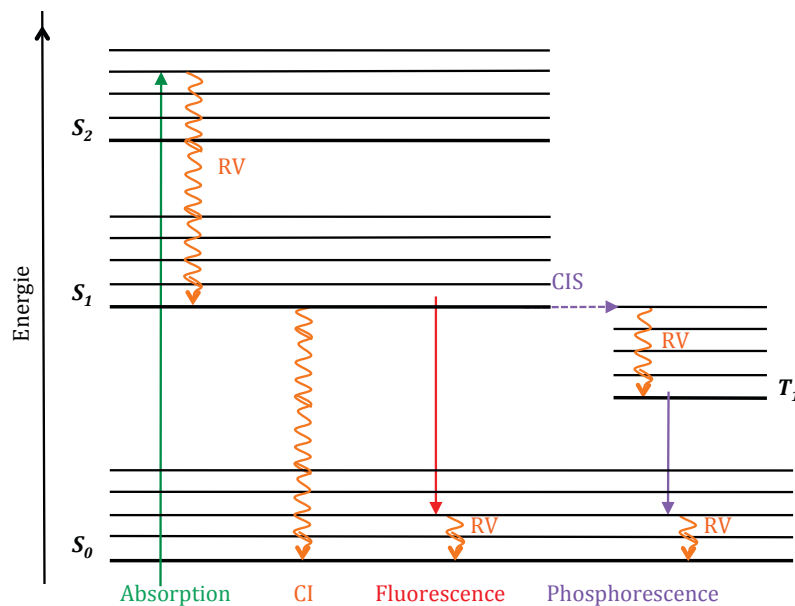


Figure 1 : Diagramme de Perrin-Jablonski représentant les phénomènes photophysiques possibles dans un état excité. RV signifie relaxation vibrationnelle, CI conversion interne et CIS signifie croisement inter-système.

L'ensemble des processus photophysiques se divise en deux familles. Les processus radiatifs dans lesquels le système absorbe ou émet un photon et les processus non-radiatifs dans lesquels aucun échange de photon n'a lieu. Ces processus non radiatifs sont souvent nommés "processus de désactivation de la fluorescence", dans le

sens où s'ils se produisent l'émission d'un photon n'a pas lieu (en anglais on parle de quenching).

L'absorption d'un photon par une molécule induit une transition électronique allant d'une orbitale moléculaire de niveau d'énergie inférieure à supérieur. Pour la transition de plus basse énergie, la molécule passe de son état fondamental, généralement singulet S_0 , à un état excité S_1 . L'efficacité de l'absorption à la longueur d'onde λ est caractérisée par le coefficient d'extinction molaire $\epsilon(\lambda)$. Après l'absorption d'un photon, la molécule est portée dans un état S_n électroniquement et vibrationnellement excité. Elle relaxe alors très rapidement (de quelques femtosecondes à quelques picosecondes) son excédent d'énergie vibrationnelle pour se placer dans le niveau vibrationnel le plus bas ($v' = 0$) de S_1 . Ce processus non radiatif est appelé relaxation vibrationnelle (RV). Plusieurs processus photophysiques permettent alors au fluorophore de se désexciter jusqu'à l'état fondamental :

La fluorescence correspond par exemple à la transition entre S_1 et un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental S_0 . Elle se produit entre 10^{-10} et 10^{-7} sec après l'absorption d'un photon et conduit à l'émission d'un photon appelée fluorescence car il n'y a pas de changement de multiplicité. C'est un processus radiatif en compétition avec deux autres processus non radiatifs. Tout d'abord la relaxation vibrationnelle entre l'état S_1 et l'état S_0 (conversion interne) dans laquelle l'énergie est convertie en chaleur. Le deuxième processus est un croisement inter-système entre l'état S_1 et l'état triplet T_1 . La phosphorescence est un processus radiatif qui permet la transition entre T_1 et S_0 . La phosphorescence et le croisement inter-système sont des transitions entre états électroniques de multiplicités différentes dont la probabilité n'est significative qu'en présence, entre autres, d'un couplage spin-orbite important. La présence sur le fluorophore d'un atome lourd par exemple, est un facteur favorisant le croisement inter-système. Les processus qui dépeuplent l'état excité sont quantifiés par deux paramètres exprimés en s^{-1} : la constante de désexcitation radiative, k_r , et la constante de désexcitation non radiative k_{nr} .

1.1.1.1 Spectres d'excitation et d'émission

■ **Spectre d'émission.** Ce spectre représente la probabilité relative qu'un photon soit émis à une longueur d'onde donnée. Le spectre est enregistré en mesurant l'intensité lumineuse en fonction de la longueur d'onde de détection et à longueur d'onde d'excitation fixe. Voici quelques propriétés du spectre d'émission :

- Le spectre d'émission de fluorescence est toujours déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'absorption. Cela provient du fait que la molécule retourne à son état fondamental à partir du niveau de vibration le plus bas ($v' = 0$, cf Figure 2 a) de l'état excité S_1 (Règle de Kasha). Il y a donc une dissipation partielle d'énergie plus ou moins importante avant l'émission fluorescente. Cette différence de longueur d'onde entre le maximum d'absorption (plus précisément de $v = 0$ à $v' = 0$ dans les spectres vibroniquement résolus) et le maximum d'émission (plus précisément de v'

= 0 à $v = 0$ dans les spectres vibroniquement résolus) est appelée déplacement de Stokes (Figure 2 b).

- Le spectre d'émission est souvent presque une image « en miroir » du spectre d'absorption. Cela vient du fait que les niveaux vibrationnels de l'état excité S_1 ($v' = 0, 1, 2, 3 \dots$) sont généralement de même nature que ceux de l'état fondamental S_0 ($v = 0, 1, 2, 3 \dots$). Lors de l'absorption du photon, il faut que l'énergie du photon (quantum d'énergie) corresponde aux transitions électroniques possibles; s'il y a un excédent d'énergie, il est converti en énergie vibrationnelle (i.e. RV) et rotationnelle (si à l'état gazeux). Par analogie à l'absorption, la molécule relaxant par fluorescence peut se retrouver sur différents niveaux vibrationnels de l'état fondamental S_0 ($v = 0, 1, 2, 3 \dots$). Cette plage d'énergie possible explique la largeur des spectres d'absorption et d'émission des fluorophores, dont un exemple est représenté sur la Figure 2.

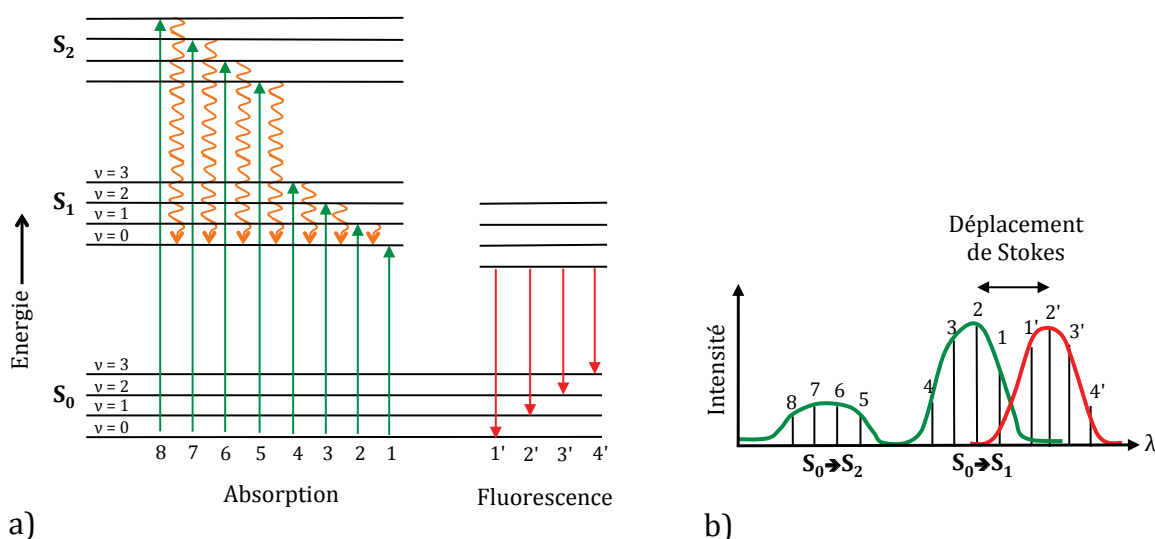


Figure 2 : a) Diagramme des niveaux d'énergie avec des niveaux vibrationnels. b) Spectre d'absorption (vert) et d'émission (rouge) correspondant.

- La forme du spectre d'émission est indépendante de la longueur d'onde d'excitation. C'est l'intensité de fluorescence qui varie en fonction de l'intensité d'absorption à la longueur d'onde d'excitation comme le montre la Figure 3.

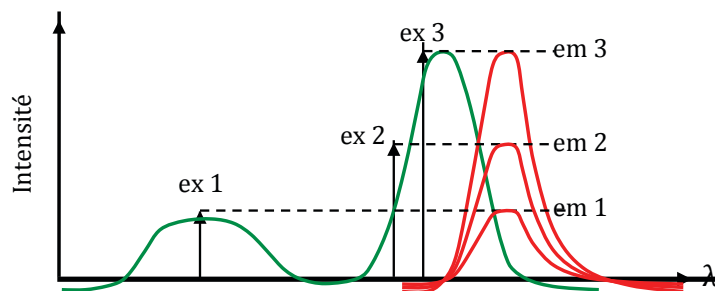


Figure 3 : Evolution de l'intensité d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

■ **Spectre d'excitation.** Il représente les variations de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation. En principe, si aucun autre processus physique ou chimique ne survient, il est superposable au spectre d'absorption qui est réellement à l'origine de la fluorescence à la longueur d'onde d'émission choisie. En pratique, le spectre d'excitation est enregistré en fixant la longueur d'onde de détection et en faisant varier la longueur d'onde d'excitation.

1.1.1.2 Rendement quantique et temps de vie de fluorescence.

Le rendement quantique de fluorescence Φ_F est un paramètre sans dimension qui mesure le rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés. En d'autres termes, il représente la probabilité pour qu'un fluorophore excité émette un photon de fluorescence. Il peut varier en fonction de certains facteurs comme le pH, la concentration, l'indice de réfraction et la polarité du solvant. Dans l'hypothèse d'un composé non phosphorescent, le rendement quantique de fluorescence se définit comme suit :

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}$$

Le rendement quantique se mesure généralement par comparaison avec des fluorophores de référence pour lesquels le rendement quantique a été déterminé par méthodes calorimétriques, ou par sphère d'intégration.

La durée de vie moyenne de la molécule dans l'état excité S_1 ou temps de vie de fluorescence (τ_F) peut également être exprimée en fonction des deux taux de désexcitation k_r et k_{nr} :

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} = \frac{\Phi_F}{k_r}$$

Pour un processus unimoléculaire (i.e. réaction d'ordre 1), la décroissance de l'intensité de fluorescence suit une loi exponentielle en fonction du temps :

$$I(t) = I_0 e^{(-t/\tau)}$$

$I(t)$ représente l'intensité de fluorescence mesurée au temps t , et I_0 l'intensité de fluorescence observée immédiatement après excitation à $t = 0$. Le temps de vie de fluorescence τ représente le temps pour lequel l'intensité de fluorescence initiale diminue de $1/e$ (soit environ 37 %). Le temps de vie de fluorescence est mesuré avec des méthodes résolues en temps, en enregistrant le déclin de fluorescence après une excitation pulsée.

Le rendement quantique et le temps de vie de fluorescence sont deux paramètres très dépendants de l'environnement de la molécule fluorescente, notamment de l'oxygénation, de la température et de la viscosité du milieu, mais aussi de la nature des substituants portés par le fluorophore. Ils peuvent permettre donc de suivre les variations de cet environnement et de suivre *in vivo* des réactions biochimiques ou métaboliques.^{7,8}

1.1.2 Limites de l'imagerie optique par fluorescence

La principale limite de l'utilisation de la fluorescence pour l'imagerie *in vivo* est la faible profondeur d'observation. Différentes interactions de la lumière avec les tissus comme la réfraction, la diffusion, l'absorption et la fluorescence provenant des tissus (autofluorescence) sont à l'origine de cette faible pénétrabilité. D'autres limitations liées aux propriétés du fluorophore seront également abordées dans cette partie.

1.1.2.1 Interactions de la lumière avec les tissus biologiques

La biophotonique est, par définition, l'utilisation des rayons visibles, des rayons ultra-violet, des rayons infrarouges et des rayons X pour l'analyse ou la modification d'objets biologiques par nature complexes. Elle consiste notamment à étudier la propagation de la lumière en milieu biologique. Les tissus biologiques sont constitués d'un grand nombre de structures de formes et de tailles diverses (cellules, membranes, vaisseaux) qui empêchent la lumière de se propager en ligne droite (phénomènes de réfraction et de diffusion). Certaines molécules (chromophores) interagissent directement avec la lumière en absorbant les photons, et en réémettant ou non des photons de fluorescence, ce qui limite la pénétrabilité de la lumière. Ces paramètres interviennent dans les algorithmes de reconstruction utilisés pour réaliser les images. Il est donc important de les identifier et de les quantifier en fonction de la nature des tissus étudiés.

- **La réfraction.** L'indice de réfraction n d'un milieu caractérise la vitesse de phase (vitesse à laquelle se propage l'onde dans l'espace) de l'onde électromagnétique dans ce milieu. Il permet de quantifier la réfringence du tissu, soit sa tendance à dévier les rayons lumineux. La lumière est déviée lorsqu'elle passe à l'interface de deux milieux

ayant des indices de réfraction différents, suivant les lois de Snell-Descartes, comme le montre la Figure 4:

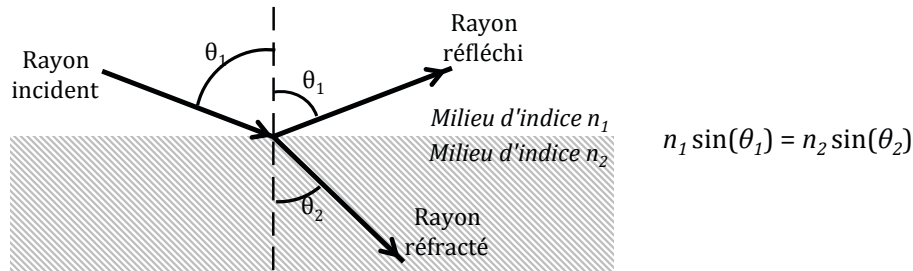


Figure 4 : *A gauche: réfraction et réflexion d'un rayon lumineux à l'interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents.*

A droite: Loi de Snell-Descartes.

Il est à noter qu'une partie de la lumière incidente peut être réfléchiée à l'interface entre les deux milieux. Après réflexion, l'onde reste dans son milieu de propagation initial. Le coefficient de réflexion qui permet de quantifier ce phénomène dépend des indices de réfraction n_1 et n_2 , de la longueur d'onde, de l'angle incident θ_1 et de la polarisation de l'onde incidente. Dans les tissus biologiques, l'indice de réfraction varie typiquement de 1,35 à 1,45 (cf annexe 1, tableau 1). Sa valeur dépend essentiellement de la teneur en eau du tissu : l'indice de réfraction de l'eau est de 1,33 et celui d'un tissu complètement déshydraté de l'ordre de 1,55.

Dans les milieux biologiques, la réfraction peut se produire à l'échelle macroscopique, à l'interface entre deux tissus d'indice de réfraction différents. Elle existe également à l'échelle microscopique, au niveau des cellules. Des variations de salinité et de concentration de substituants entre les différents compartiments cellulaires ainsi que les membranes phospholipidiques qui les séparent les uns des autres génèrent des réfractions en chaîne des photons qui pénètrent les tissus. Ces phénomènes sont à la base de la diffusion de la lumière dans les milieux biologiques.

■ **La diffusion.** La diffusion de la lumière se produit lorsqu'une onde électromagnétique rencontre une particule d'indice de réfraction différent de celui du milieu environnant. La particule se comporte alors comme une source de lumière secondaire avec une distribution angulaire d'intensité qui lui est propre, et qui dépend en particulier de sa taille, de son indice de réfraction, ainsi que de la longueur d'onde d'illumination. Différents modèles mathématiques permettent de calculer l'angle entre la direction de l'onde incidente et la direction de l'onde diffusée. La taille de la particule par rapport à la longueur d'onde dicte le choix du modèle le plus adapté. Les petites structures diffusent de façon quasi isotrope (régime de Rayleigh) alors que celles qui ont des tailles supérieures à quelques microns relèvent du régime de Mie, dans lequel la diffusion est dirigée vers l'avant, selon la direction du faisceau incident. Lorsque la taille des particules est beaucoup plus grande que la longueur d'onde, les lois de l'optique géométrique suffisent à traiter le problème. Dans les tissus biologiques, c'est à

l'intérieur des cellules, au niveau des organelles, qu'a lieu la diffusion de la lumière. La taille de ces particules étant évaluée autour de $1\ \mu\text{m}$, c'est le régime de diffusion de Mie qui s'applique aux longueurs d'onde de la fenêtre thérapeutique. Dans ce régime, la répartition spatiale de la lumière est diffusée vers l'avant. Le diagramme de diffusion prend la forme d'un lobe ovoïde et certaines directions sont alors privilégiées. Enfin, l'intensité de la lumière diffusée augmente avec la différence entre l'indice de réfraction du centre diffuseur et celui du milieu d'accueil.

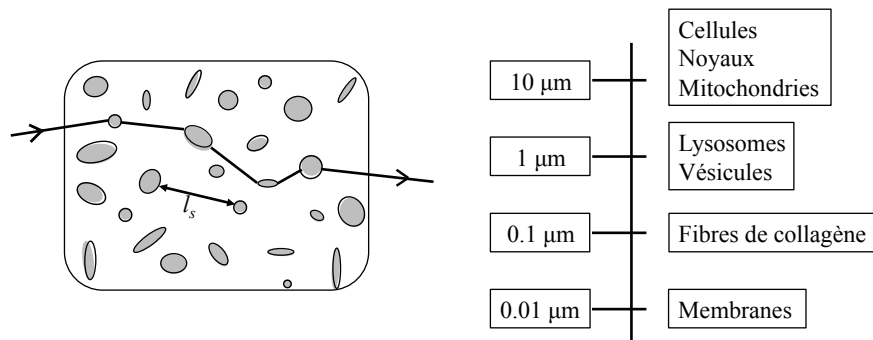


Figure 5 : A gauche: définition du libre parcours moyen l_s .

A droite: ordre de grandeur des principales structures diffusantes dans les tissus.

Les organelles étant de tailles variées (Figure 5), il est cependant difficile de prédire précisément les caractéristiques de diffusion des tissus biologiques. On raisonne donc avec un coefficient de diffusion moyen caractérisant le milieu. Ce coefficient de diffusion μ_s (lui aussi généralement exprimé en cm^{-1}) est indirectement proportionnel au libre parcours moyen (l_s), c'est-à-dire à la distance moyenne que parcourt un photon entre deux événements de diffusion successifs:

$$l_s = 1 / \mu_s$$

Dans les tissus biologiques le libre parcours moyen est de l'ordre de 20 à 100 μm (cf Figure 6).

Une autre grandeur caractéristique de la diffusion en milieu biologique est le facteur d'anisotropie g . Il permet de caractériser la distribution angulaire de la diffusion. La Figure 6 illustre l'influence du facteur d'anisotropie sur le diagramme de diffusion. Pour une diffusion parfaitement isotrope (indépendante de la direction du photon incident, donc avec une grande incertitude sur l'angle de rediffusion), g est nul. Il vaut 1 dans le cas d'une diffusion complètement vers l'avant (ce qui équivaldrait à une propagation sans diffusion). Dans les tissus biologiques, la diffusion se fait préférentiellement vers l'avant, avec un facteur d'anisotropie de l'ordre de 0,7 à 0,99. Quelques valeurs de coefficient de diffusion et de facteur d'anisotropie dans certains tissus biologiques en fonction de la longueur d'onde sont données dans l'annexe 1 (tableau 2).

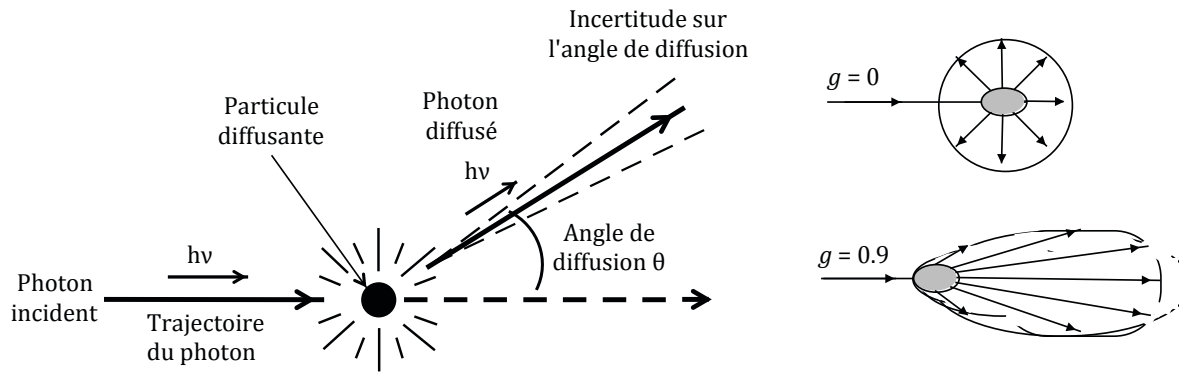


Figure 6 : à gauche: schéma de diffusion d'un photon.

A droite: illustration du facteur d'anisotropie g .

La diffusion constitue donc un frein à la propagation de la lumière dans les tissus biologiques.

■ **L'absorption.** A l'échelle moléculaire, l'absorption d'un photon incident sur une molécule se produit lorsque l'énergie de ce photon correspond à une énergie de transition électronique, vibrationnelle ou rotationnelle de la molécule. Cette énergie absorbée par la molécule est essentiellement transformée en chaleur dans les tissus biologiques. Dans le spectre d'absorption des tissus interviennent ses nombreux constituants. L'eau, qui est le principal composant des tissus biologiques (80 %), absorbe dans l'ultraviolet et surtout dans l'infrarouge. L'hémoglobine contribue le plus à l'absorption de la lumière dans le rouge et le proche infrarouge. Son spectre d'absorption dépend de son état d'oxygénation, comme le montre la Figure 7.

D'autres chromophores peuvent être à l'origine de l'absorption dans le domaine de l'ultraviolet et du visible. C'est le cas de l'ADN, ou de protéines comme la mélanine, qui joue un rôle dans le coefficient d'absorption de la peau. Les lipides sont également présents dans la plupart des régions de l'organisme. Leur absorption est du même ordre de grandeur que l'eau dans le proche infrarouge ($3 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ à 700 nm).⁹ On peut également citer le cytochrome c oxydase qui joue un rôle dans le cycle respiratoire de la cellule. Son coefficient d'absorption ($0,5 \text{ cm}^{-1}$ à 700 nm) est semblable à celui de l'hémoglobine mais sa concentration dans les tissus est plus faible d'un ordre de grandeur.¹⁰ C'est dans la région rouge et proche infrarouge (typiquement entre 650 nm et 900 nm) que l'absorption globale des tissus biologiques est minimale. Cette zone est appelée la fenêtre thérapeutique (Figure 7).¹¹

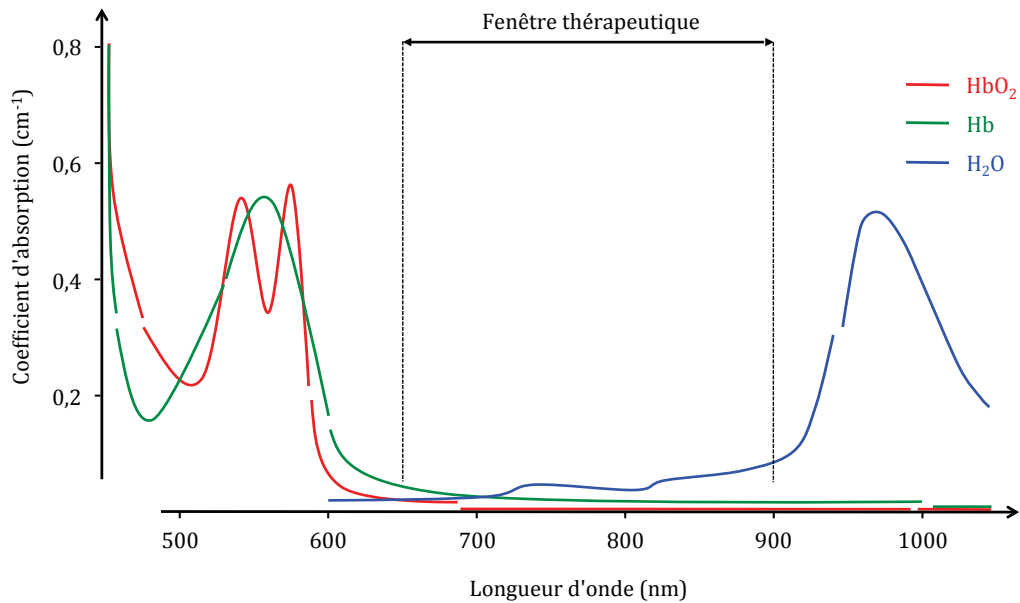


Figure 7 : spectre d'absorption de l'hémoglobine, de l'oxyhémoglobine et de l'eau. la fenêtre thérapeutique se situe entre 650 et 900 nm.

Bien que la profondeur d'observation soit supérieure dans la fenêtre thérapeutique, elle ne dépasse généralement pas quelques centimètres. En effet, lorsque l'absorption de la lumière diminue fortement, c'est la diffusion de la lumière qui devient alors le facteur limitant la pénétrabilité de la lumière dans les tissus et la résolution des images obtenues.

■ **L'autofluorescence des tissus.** La fluorescence intrinsèque des tissus est due à la présence dans l'organisme de certaines molécules appelées fluorophores endogènes. Parmi ces molécules se trouvent des acides aminés, des protéines structurales (collagène et élastine), des enzymes et coenzymes ayant un rôle dans le métabolisme cellulaire et des lipides. Les dérivés porphyriniques contenus dans l'hémoglobine sont les principaux émetteurs dans la zone du rouge et proche infra-rouge.¹² Le nombre et la nature des fluorophores endogènes varient en fonction de la longueur d'onde utilisée. Les maxima d'excitation et d'émission de ces différents composés dans le domaine du visible et du proche infrarouge sont donnés dans l'annexe 1 (tableau 3).

Dans le cas de l'utilisation d'un agent de contraste fluorescent (fluorophore exogène), l'autofluorescence des tissus peut générer un bruit de fond de fluorescence dépendant de la longueur d'onde d'excitation. Afin de s'en affranchir, la fenêtre du proche infrarouge sera privilégiée. La fluorescence endogène est en effet plus faible dans cette gamme de longueur d'onde, comme le montre la Figure 8:

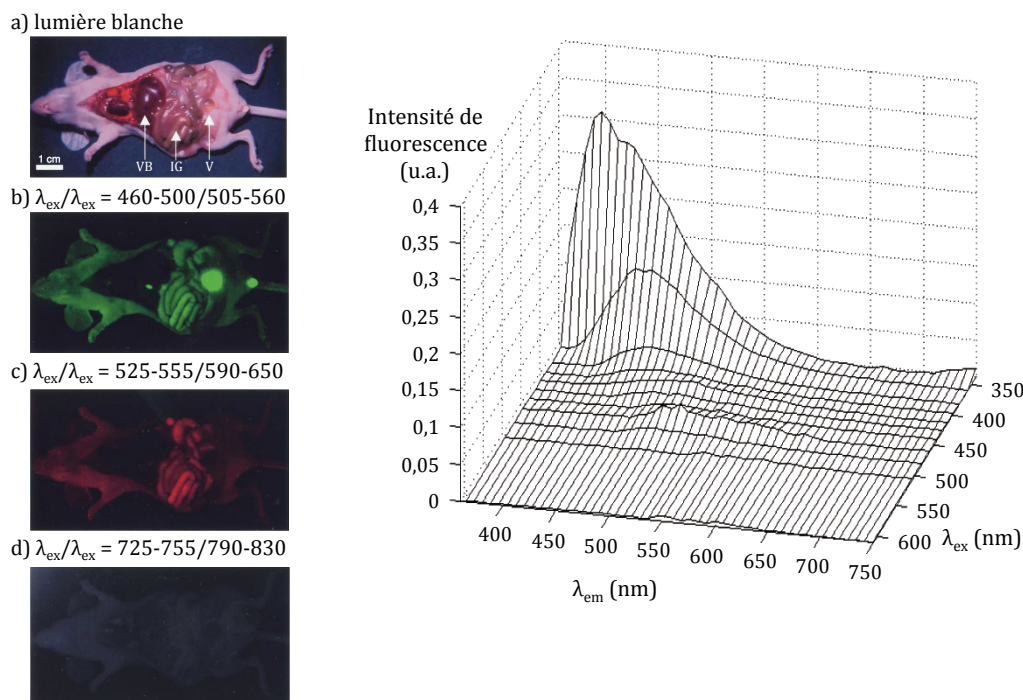


Figure 8. À gauche: autofluorescence des tissus d'une souris en fonction de la longueur d'onde d'éclairement VB = vésicule biliaire, IG = intestin grêle, V = vessie.¹³ Reproduit avec la permission de *Current Opinion in Chemical Biology*.

À droite: autofluorescence *in vivo* en fonction de la longueur d'onde d'excitation (λ_{ex}) et d'émission (λ_{em}).⁴ Reproduit avec la permission de *Nature Medicine*.

Il est intéressant de noter que les propriétés de fluorescence des tissus peuvent être utilisées pour l'imagerie des tumeurs.¹⁴ Les tissus tumoraux présentent par exemple un métabolisme différent du tissu sain, et une variation peut se retrouver sur les spectres d'émission et/ou le temps de vie de fluorescence de ces molécules. Les anomalies dans le ratio entre hémoglobine oxygénée et non-oxygénée permettent non-seulement de localiser les tumeurs, mais donnent également des informations sur leur stade de développement.¹⁵⁻¹⁸

D'autres approches plus récentes consistent à détecter la fluorescence de photoprotéines.¹⁹ La protéine fluorescente verte (GFP pour Green Fluorescent Protein), protéine naturellement sécrétée par certaines méduses, est intrinsèquement fluorescente. Son gène peut être fusionné *in vitro* au gène d'une protéine que l'on souhaite étudier. Le gène recombinant est ensuite réintroduit dans des cellules ou dans un embryon, qui va alors synthétiser la protéine de fusion fluorescente. Le gène codant pour la GFP peut ainsi être intégré aux génomes de cellules cancéreuses. Cette méthode est particulièrement adaptée à l'étude *in vitro* de l'expression de certains gènes, ainsi que de la distribution cellulaire et l'externalisation de certaines protéines.

1.1.2.2 Désactivation et photoblanchiment du fluorophore.

La désactivation et le photoblanchiment sont deux processus qui entraînent un affaiblissement de l'intensité de la fluorescence. Les deux phénomènes se distinguent par le fait que le quenching est souvent réversible alors que le photoblanchiment ne l'est pas.

■ **La désactivation.** Elle provient de mécanismes qui entrent en compétition avec l'émission de fluorescence et qui produisent une dissipation non radiative de l'énergie correspondant à l'écart entre l'état excité et l'état fondamental. La collision entre un fluorophore excité et une autre molécule non fluorescente (notamment l'oxygène) en solution est un cas fréquent de désactivation dit de transfert d'énergie non radiatif. La concentration du fluorophore est un autre paramètre influant sur la désactivation de fluorescence. Les environnements généralement très riches en électrons des fluorophores organiques favorisent en effet les interactions π - π . Au-delà d'une certaine concentration, des empilements de fluorophores peuvent se former (agrégation), ce qui provoque une extinction de la fluorescence. D'autres processus de désactivation intermoléculaires seront décrits dans le chapitre III.1.

■ **Le photoblanchiment.** C'est une limite importante de l'imagerie par fluorescence. C'est une réaction chimique photo-induite et irréversible de destruction des liaisons moléculaires responsables de la fluorescence. Il s'agit essentiellement de réactions d'oxydation avec des radicaux libres provenant de l'oxygène (principalement l'oxygène singulet). Ces radicaux sont notamment issus du métabolisme normal de l'oxygène (origine endogène) ou de rayonnements ionisants (origine exogène). Lorsque l'on excite le fluorophore par une source lumineuse, sa cinétique de photoblanchiment est accélérée. En effet, les fluorophores à l'état triplet peuvent générer de l'oxygène singulet dans leur environnement proche par transfert non radiatif (cf Figure 9).

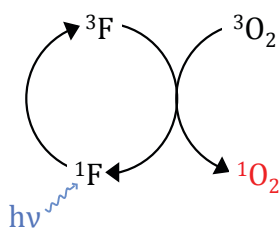


Figure 9 : formation d'oxygène singulet (1O_2) à partir d'oxygène triplet (3O_2). Le fluorophore à l'état triplet (3F) est désactivé au moment du contact et passe à l'état singulet (1F).

Chaque fluorophore présente une cinétique de photoblanchiment particulière. Le photoblanchiment est d'autant plus probable que le nombre de cycles excitation/désactivation est élevé. Il varie avec la longueur d'onde d'excitation et est

plus important lorsque l'énergie des photons incidents correspond à un maximum d'absorption du spectre d'excitation du fluorophore. Il est intéressant de noter que les sources lumineuses utilisées en imagerie sont généralement monochromatiques, ce qui permet, entre autre, de limiter le nombre de photons absorbés, et donc le rendement de photoblanchiment.²⁰

1.2 Méthodes d'imagerie par fluorescence

Ce chapitre décrit les principales techniques d'imagerie optique par fluorescence et leurs applications. Bien que ces techniques d'imagerie soient applicables à différents domaines de la médecine, seules les applications concernant la détection des cancers seront abordées, par souci de simplicité. Trois méthodes d'imagerie par fluorescence utilisables *in vivo* ou *ex vivo* seront détaillées: l'imagerie de fluorescence par réflexion, la microscopie par fluorescence et la tomographie de fluorescence.

Le Tableau 2 réunit les principales méthodes d'imagerie optique *in vivo*, ainsi que les types de photons détectés (absorbés, diffusés ou photons de fluorescence), les limites de pénétrabilité ainsi que les domaines de longueurs d'onde utilisés pour chacune d'entre elles. Les méthodes basées sur la détection de photons absorbés (abs) ou diffusés (diff) constituent une partie importante des méthodes d'imagerie optique. Cependant, elles ne seront pas abordées dans la suite de ce manuscrit. Seules les méthodes d'imagerie optique par fluorescence (fluo) seront détaillées.

Tableau 2: méthodes d'imagerie optique *in vivo*.⁴

Technique	Type de contraste	Profondeur	Longueur d'onde
Résolution microscopique			
Microscopie en épifluorescence	Abs, Fluo	20 μm	Vis
Confocale	Fluo	500 μm	Vis
Biphotonique	Fluo	800 μm	Vis
Résolution mésoscopique			
Tomographie à cohérence optique (OCT)	Diff	2 mm	Vis, NIR
Interférométrie de Speckle	Diff	1 mm	Vis, NIR
Résolution macroscopique			
Endoscopie	Abs, Diff, Fluo	<5 mm	Vis
Tomographie optique diffuse (DOT)	Abs, Diff, Fluo	<20 cm	NIR
Imagerie de fluorescence en réflexion (FRI)	Abs, Fluo	<7 mm	NIR
Tomographie de fluorescence moléculaire (FMT)	Fluo	<20 cm	NIR
Imagerie de bioluminescence	Em	<3 cm	500-600 nm

Abs = absorbance, Fluo = fluorescence, Diff = diffusion, Em = émission

Ce tableau montre que l'imagerie optique par fluorescence permet d'obtenir des images à l'échelle microscopique (cellules), comme à l'échelle macroscopique (tissus, organes). Pour les techniques d'imagerie à l'échelle macroscopique, il est nécessaire d'optimiser la profondeur d'observation; l'utilisation de fluorophores du proche infra-rouge devient alors indispensable.

1.2.1 L'imagerie de fluorescence par réflexion

La technique d'imagerie de Fluorescence par Réflexion (FRI) inspirée des techniques de vision industrielle est un outil efficace pour détecter la fluorescence des tissus en deux dimensions. Elle permet de reconstituer la carte de distribution d'un fluorophore endogène ou exogène à la surface d'un tissu, à des profondeurs inférieures au cm.⁴ L'imagerie de fluorescence par réflexion fonctionne en épiillumination, c'est-à-dire que la source de lumière et le détecteur sont placés du même côté de l'échantillon, comme le montre la Figure 10. On utilise une source de lumière continue et spatialement étendue. Une caméra CCD équipée d'un filtre est utilisée pour ne détecter que les photons de fluorescence.

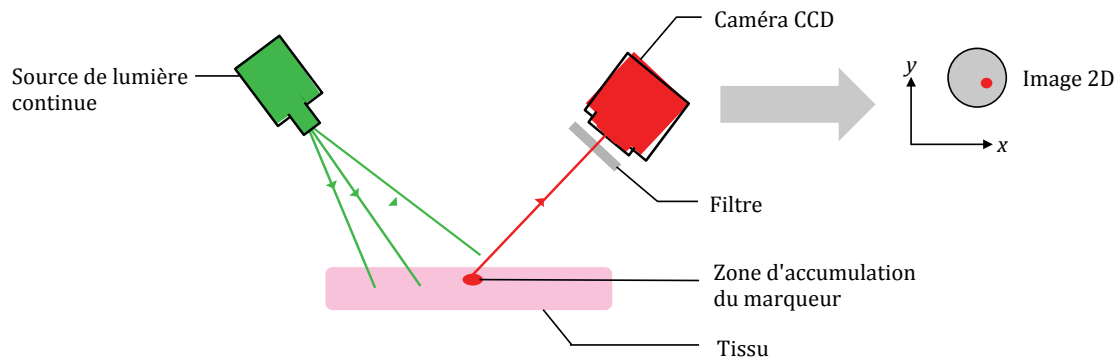


Figure 10 : schéma de principe de l'imagerie de fluorescence par réflexion.

L'imagerie de fluorescence par réflexion a été d'abord appliquée à des études sur petit animal. Leur petite taille implique que certains organes sont suffisamment proche de l'épiderme pour pouvoir être imagés par cette technique.²¹ Cependant, l'application phare de la FRI est l'imagerie intraopératoire assistée par fluorescence.

■ Applications cliniques en imagerie intraopératoire.

La chirurgie pratiquée en oncologie (résection des tumeurs principalement) présente des caractéristiques favorables à l'utilisation de la FRI.²² Les structures à examiner (muqueuses, peau ou membranes...) se trouvent la plupart du temps en surface ou très proche de la surface observée par le chirurgien. Le premier acte de chirurgie assistée par fluorescence sur un humain a été réalisé en 2011 par l'équipe du professeur van Dam.²³ Après injection au patient d'un marqueur fluorescent spécifique des cellules cancéreuses du cancer de l'ovaire, la résection des tissus contaminés a été assistée par la technique de FRI. En pratique, la fluorescence captée par la caméra CCD est restituée sur un écran intégré au bloc opératoire et fournit au chirurgien une cartographie des tissus tumoraux en temps réel, sous forme d'une image hybride (Figure 11 C). En effet, les longueurs d'ondes de la fenêtre thérapeutique (650-900 nm) sont peu, voire pas détectables par l'œil humain. Notons que la recherche s'intensifie dans le développement de systèmes miniaturisés appelés "fluorescence google" combinant la source d'excitation ainsi que le détecteur photonique (Figure 11 B).

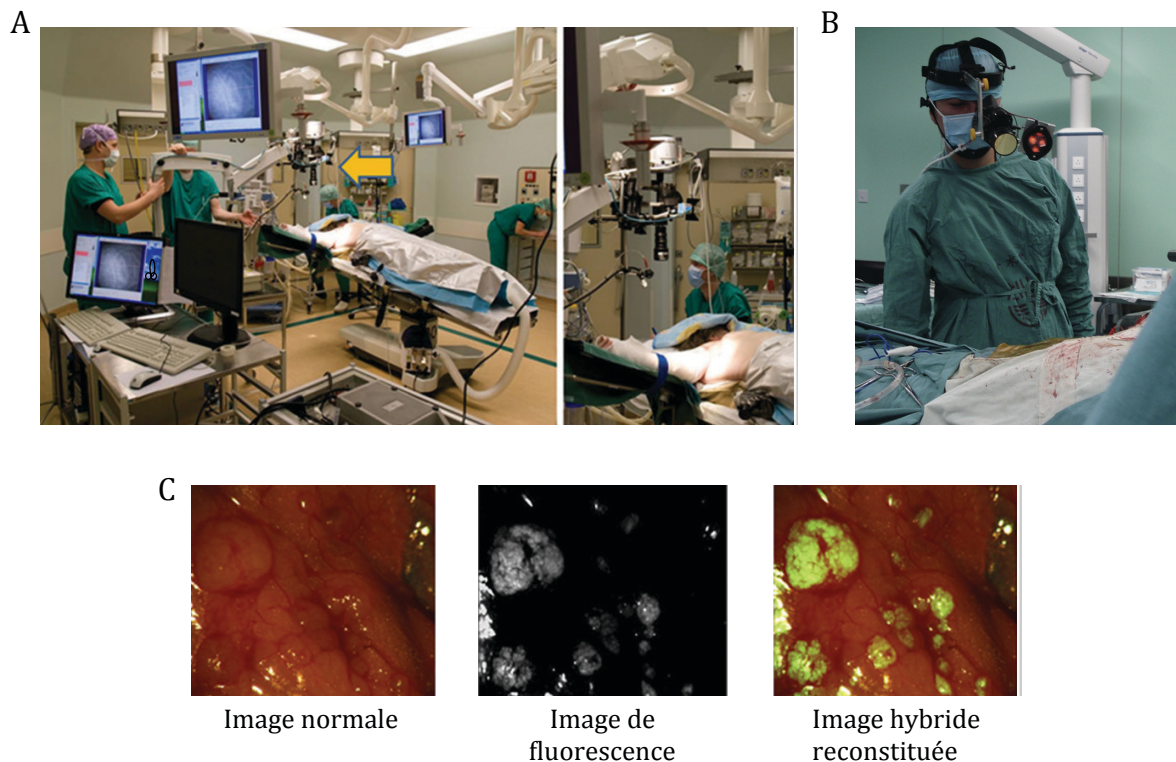


Figure 11 : A/Système utilisé par Van Dam et al.²³ B/"Fluorescence google" développé par Liu et al.²⁴ C/Reconstitution de l'image hybride.²³ Reproduit avec la permission de Nature Medicine et Translational Research.

L'imagerie de fluorescence intraopératoire augmente la rapidité et l'efficacité de l'acte chirurgical en permettant au chirurgien de différencier plus précisément les tissus contaminés des tissus sains. La principale limite de cette technique est le nombre restreint de marqueurs fluorescents actuellement disponibles (cf Chapitre 2.2). Le traceur doit en effet avoir suivi les étapes de préclinique réglementaires et les différentes phases de validation clinique avant de pouvoir être injecté à un patient.²⁵

1.2.2 Microscopie par fluorescence

La microscopie de fluorescence est un outil couramment utilisé par les biologistes en raison de ses possibilités de détection *in-vivo* de particules qui ne peuvent être visualisées en microscopie optique conventionnelle. Elle est particulièrement adaptée à l'étude des cellules (*in vitro*) et des tissus biologiques mis à nu (*in vivo*) ou excisés (*ex vivo*) ; c'est donc une méthode d'imagerie invasive. Les échantillons ne doivent pas excéder une certaine épaisseur (1 mm). Plus le grossissement est élevé, plus cette profondeur est faible, ce qui empêche d'avoir une image nette sur la totalité d'un objet étendu. Cependant, les résolutions d'images obtenues avec ces méthodes sont difficilement égalables avec les autres méthodes d'imagerie médicale. La microscopie

par fluorescence compte parmi les rares méthodes d'imagerie médicale permettant d'imager plusieurs cibles en même temps, en utilisant différents marqueurs fluorescents spécifiques et des filtres appropriés.

La microscopie confocale permet d'améliorer la faible profondeur d'image disponible en microscopie classique (ou microscopie en champ large). Le microscope confocal a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques ». En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. La Figure 12 présente le schéma de principe de la microscopie confocale de fluorescence. Le rayon lumineux excitateur pénètre dans l'échantillon fluorescent. Il y a alors émission de rayons fluorescents provenant de différents plans de la préparation. Un trou de filtrage ou "pinhole" élimine le signal fluorescent provenant des plans non-focaux, afin de sélectionner les rayons émis par le plan focal de l'échantillon. Ces rayons passent au travers d'un bloc de filtrage des longueurs d'onde (miroir dichroïque) qui ne laisse passer que les longueurs d'onde de fluorescence, avant d'arriver au photodétecteur.

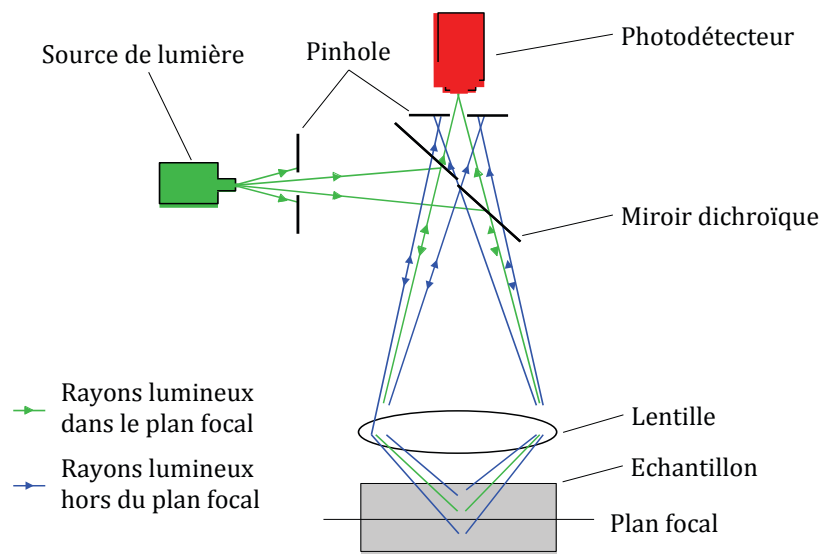


Figure 12 : schéma de principe de la microscopie confocale de fluorescence.

Les limites de résolution spatiale du microscope confocal sont directement liées à la taille du trou de filtrage. Il est nécessaire de trouver un compromis entre la résolution et la quantité de lumière atteignant le détecteur.

■ Applications en microscopie intravitale et ex vivo

La microscopie par fluorescence trouve un intérêt particulier en oncologie, au niveau pré-clinique et clinique. L'utilisation de cette technique sur des tissus vivants est appelée microscopie intravitale (IVM).²⁶ Elle fournit des images avec des résolutions inégalables allant de 1 à 10 μm . Cela permet d'imager une multitude de processus cellulaires tels que le microenvironnement des tumeurs (pH, pO_2), la distribution de médicaments dans la cellule, les activités d'enzymes, de promoteurs et de gènes, les mécanismes de multiplication des cellules cancéreuses et de production de métastases et les interactions entre différentes sous-populations de cellules dans les tumeurs. La méconnaissance de l'impact des colorants fluorescents sur le métabolisme de la cellule constitue une limite importante de cette approche. Une seconde limite concerne la profondeur d'observation ne dépassant pas le millimètre: les tissus observés doivent ainsi être mis à nu ou excisés. L'enjeu de ces méthodes d'observation consiste donc à trouver les moyens les moins traumatisants possible d'étudier les tissus afin d'influer au minimum sur leur environnement cellulaire.

La microscopie par fluorescence est également utilisée en complément de la technique FRI pour la chirurgie assistée par fluorescence.²³ Elle permet d'analyser en détail l'environnement cellulaire des tissus excisés (examen *ex-vivo*) et permet notamment de connaître pendant l'opération le stade de développement de la tumeur (Figure 13). Ces informations sont importantes puisqu'elles peuvent conduire le chirurgien à continuer son investigation des tissus contaminés si la tumeur est déclarée métastatique.

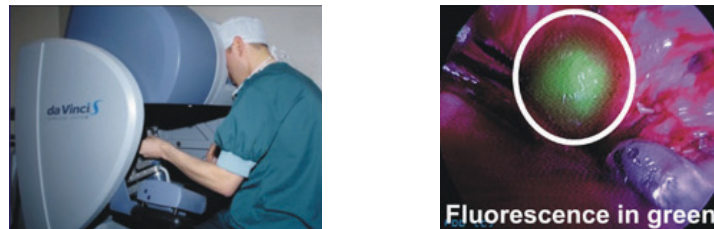


Figure 13: *microscopie par fluorescence ex vivo au cours d'une opération.*²⁷ Reproduit avec la permission de *European Urology*.

Une approche plus récente consiste à utiliser des fibres optiques pour pallier la limitation de pénétrabilité de la lumière dans les tissus. Des méthodes de microscopie confocale fibrées (ou microendoscopie confocale) permettent de réaliser de manière non invasive (sans excision des tissus) des "biopsies optiques".²⁸ Cette technologie pourrait être utilisée en complément des techniques FRI en chirurgie assistée par fluorescence et permettre au chirurgien de localiser des tissus tumoraux profonds et de mieux définir la marge de résection des tissus contaminés.

1.2.3 La tomographie moléculaire de fluorescence

La tomographie moléculaire de fluorescence (FMT) permet d'obtenir une reconstruction en trois dimensions de la localisation des marqueurs fluorescents dans les tissus. L'échantillon est balayé avec la source laser et la caméra CCD enregistre les photons de fluorescence. Chaque position du laser correspond à une projection différente. L'empilement de ces projections permet de remonter à la carte 3D de fluorescence par l'intermédiaire d'un algorithme de reconstruction (Figure 14). Cette méthode utilise un processus d'inversion, c'est-à-dire qu'elle nécessite l'élaboration préalable d'un modèle, décrivant suffisamment fidèlement les phénomènes optiques tels qu'ils sont mesurés. On reconstruit ensuite l'image en se fondant sur ce modèle. La qualité des images reconstruites dépend des performances du système expérimental, mais elle est également liée à la modélisation et au processus d'inversion. La tomographie est à mettre en contraste avec l'imagerie directe qui fournit une simple carte de détection des photons et donc des images en deux dimensions. La tomographie permet d'augmenter la profondeur d'observation, mais fournit des images d'une résolution spatiale inférieure à l'imagerie directe. Cette observation est d'ailleurs généralisable pour toutes les méthodes d'imagerie optique : obtenir des images plus profondément dans les tissus implique une perte de la résolution spatiale.

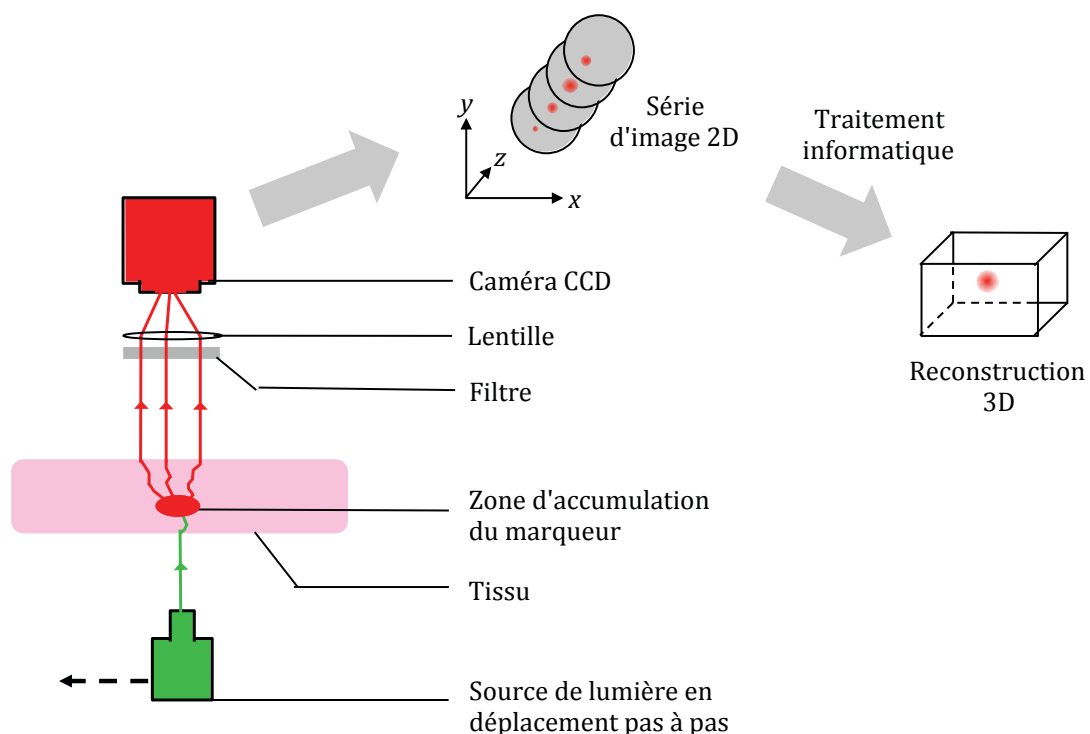


Figure 14 : *principe de la tomographie moléculaire de fluorescence.*

La tomographie moléculaire de fluorescence fonctionne en transillumination, par opposition à l'imagerie en épi-illumination (imagerie directe). Les photons émis doivent traverser l'échantillon pour être captés par le détecteur qui est placé à l'opposé de la source de lumière. La transillumination permet de placer la source de lumière plus proche de l'échantillon qu'en épi illumination pour des raisons de contrainte optique. L'excitation lumineuse est donc plus intense et cela se traduit par un gain de sensibilité et de contraste. En revanche, certaines perturbations causées par les photons provenant de la source et atteignant le détecteur peuvent être rencontrées. Le montage en épi-illumination constitue par ailleurs un moyen de s'affranchir de ce phénomène. Notons à ce titre que les photons de fluorescence sont émis dans toutes les directions de l'espace à partir du fluorophore, autorisant une de placer le détecteur en dehors de l'axe d'excitation du laser.

Un des principaux avantages de la tomographie est qu'elle permet de réaliser une quantification du fluorophore. En transillumination, la distance cumulée du trajet des photons incidents et de celui des photons de fluorescence est indépendante de la profondeur du fluorophore dans le tissu. Inversement, en épi-illumination, cette distance est inversement proportionnelle à la profondeur du fluorophore. Le nombre de photons de fluorescence dépend donc de la profondeur de la zone d'accumulation du marqueur, empêchant toute quantification du marqueur.²⁹

Parmi les méthodes de tomographie optique de fluorescence, il faut citer la Tomographie Optique Diffuse de Fluorescence (fDOT) qui utilise une source de lumière continue. Plus récemment des approches basées sur une source de lumière impulsionnelle (laser femto- ou picoseconde) et un détecteur résolu en temps sont apparues, notamment la tomographie optique diffuse résolue en temps (TR-fDOT). La mesure du temps de vol des photons de fluorescence à travers les tissus est une information supplémentaire qui permet d'augmenter la résolution et d'imager plus profondément. Elle permet notamment de discriminer les photons incidents des photons de fluorescence et d'augmenter ainsi le rapport signal/bruit (Figure 15).³⁰

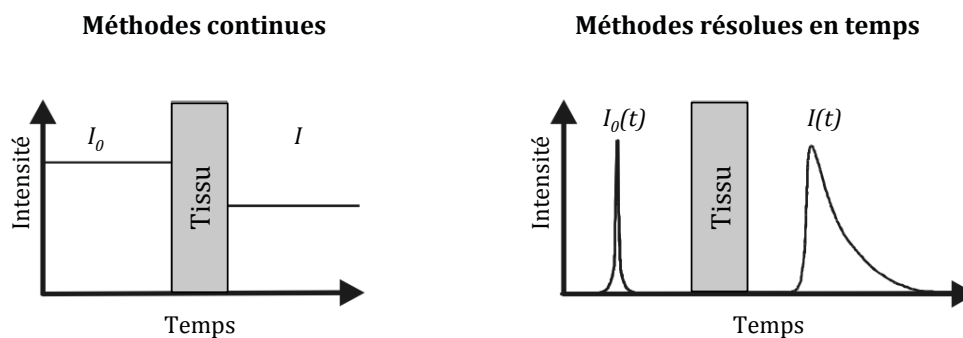


Figure 15: schéma de principe des méthodes continues et résolues en temps.³¹

Les méthodes résolues en temps souffrent cependant de la complexité à traiter le volume important de données recueillies. De ce fait, une instrumentation sophistiquée et

difficilement miniaturisable est nécessaire. Le second point faible de ces méthodes est relatif à la puissance des lasers qui peuvent générer un échauffement important des tissus.

Plusieurs sociétés, parmi lesquelles PerkinElmer, Bruker et TriFoil Imaging commercialisent des systèmes utilisables pour la tomographie moléculaire de fluorescence.

■ Applications en imagerie pré-clinique.

Le montage en transillumination implique que l'épaisseur des échantillons pouvant être analysés doit être inférieure à la limite de pénétrabilité des rayons lumineux dans les tissus. Des profondeurs d'observation de 7 à 14 cm pourraient théoriquement être atteignables en fonction des tissus.⁴ Cette technique est donc limitée à des études précliniques sur les petits animaux (Figure 16). Elle permet par exemple d'étudier en temps réel l'apparition, l'évolution ou la disparition des foyers tumoraux et donne des informations qualitatives et quantitatives sur les tissus contaminés.³² C'est donc une méthode de choix pour évaluer l'influence de traitements antitumoraux sur l'évolution des cancers. A ce titre, elle participe activement au processus de validation pré-clinique des traitements anti-cancéreux.

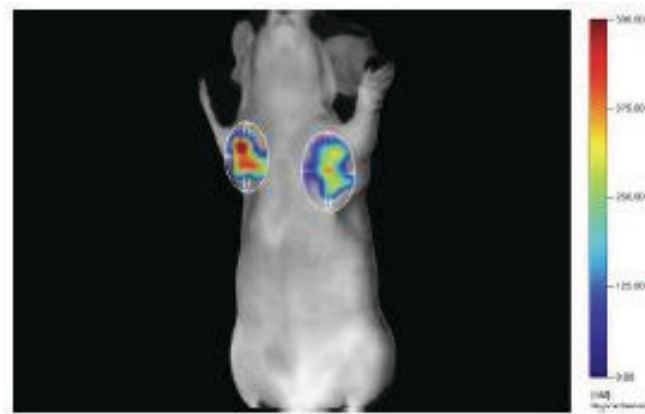


Figure 16 : image d'une souris obtenue par tomographie moléculaire de fluorescence.³³

Reproduit avec la permission de European Urology.

L'efficacité des méthodes d'imagerie optique de fluorescence *in vivo* repose sur deux points essentiels. L'appareillage tout d'abord (source d'excitation, détecteur photonique et système de traitement des données) influe sur les limites de sensibilité et la résolution spatiale des images obtenues. Le deuxième point tout aussi important est le choix du marqueur fluorescent dont les propriétés optiques influent sur les limites de pénétrabilité de la lumière dans les tissus mais aussi sur la spécificité du marquage des tissus ciblés.

2 Marqueurs fluorescents pour la détection des tumeurs

Les marqueurs fluorescents pour l'imagerie utilisés en oncologie sont généralement constitués de deux composantes : un fluorophore et une unité de reconnaissance qui permet d'orienter le marqueur vers les tumeurs. On parle alors d'agent bifonctionnel. (Figure 17).

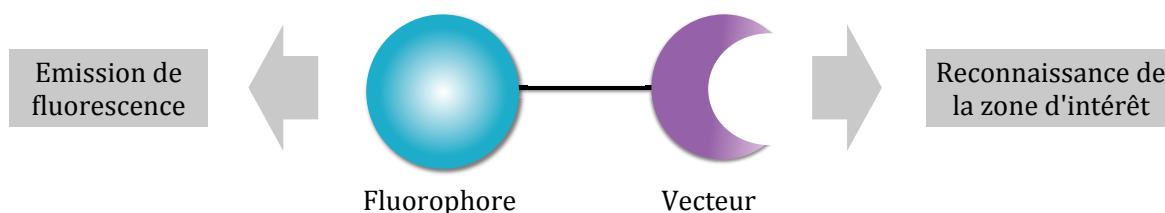


Figure 17 : les deux fonctionnalités d'un marqueur fluorescent pour la détection des tumeurs.

Le cahier des charges pour ces marqueurs fluorescents comprend une multitude de critères concernant les caractéristiques photophysiques du fluorophore, les propriétés de liaison du vecteur avec sa cible ou encore la toxicité de la molécule vis-à-vis de l'organisme.

2.1 Cahier des charges pour les marqueurs fluorescents utilisés en imagerie

2.1.1 Propriétés photophysiques

■ **Fenêtre d'absorption et d'émission.** Le fluorophore doit préférentiellement absorber et émettre dans la fenêtre thérapeutique (entre 650 et 900 nm). Cette caractéristique est d'autant plus importante que la profondeur d'observation est élevée, notamment pour les méthodes tomographiques. En revanche, les méthodes de microscopie de fluorescence permettent l'utilisation de fluorophores absorbant et émettant à des longueurs d'ondes inférieures à 650 nm.²⁶

- **Déplacement de Stokes.** Un grand déplacement de Stokes permet de limiter la détection de lumière incidente par le photodétecteur, et d'augmenter le rapport signal/bruit. Certains complexes de lanthanides possèdent des déplacements de Stokes de plusieurs centaines de nanomètres. Les fluorophores organiques possèdent des déplacements de Stokes relativement faibles, généralement compris entre 10 et 30 nm. Des filtres d'excitation et d'émission doivent alors être utilisés afin d'éviter que le détecteur ne capte les photons d'excitation.
- **Brillance.** Le fluorophore doit posséder une forte brillance (produit du coefficient d'extinction molaire ϵ et du rendement quantique de fluorescence ϕ_F) et la conserver en milieu biologique.³⁴ Les propriétés photophysiques de certains fluorophores peuvent varier en fonction de certains paramètres, notamment du pH. Ces fluorophores peuvent être utilisés en tant que sondes "intelligentes", ou "smart probes" activables ou désactivables dans certaines conditions. Selon l'application visée, il peut également être préférable d'utiliser plutôt un fluorophore dont l'émission de fluorescence est indépendante de son environnement.
- **Photoblanchiment.** Le fluorophore doit posséder une bonne résistance au photoblanchiment.
- **Fonctionnalisation.** Le fluorophore doit être facilement fonctionnalisable afin de pouvoir être lié à une unité de reconnaissance (bioconjugaison).

2.1.2 Propriétés physico-chimiques

- **Solubilité.** Le marqueur fluorescent doit posséder une bonne solubilité en milieu physiologique. Les fluorophores du proche infra-rouge (ou fluorophores NIR) sont généralement hydrophobes et il est donc nécessaire de les fonctionnaliser par des groupements augmentant leur solubilité dans l'eau. Il s'agit pour l'essentiel de groupements de type PEG de longueur variable, ou des groupements ioniques de type sulfonate ou ammonium. Notons que ces groupements ioniques influencent de manière non négligeable la biodistribution du marqueur ainsi que ses propriétés d'élimination par l'organisme.³⁵ Les groupements ammonium sont par exemple connus pour favoriser le passage de la membrane cellulaire.³⁶ La nature du bras espaceur reliant le fluorophore au vecteur joue également un rôle dans la solubilité de la molécule. Notons également que la solubilité du fluorophore doit se rapprocher autant que possible de la solubilité du vecteur, afin de modifier le moins possible sa biodistribution et ses propriétés de reconnaissance.
- **Poids moléculaire.** Le poids moléculaire du fluorophore doit être le plus petit possible afin d'affecter le moins possible les propriétés de liaison de l'unité de

reconnaissance avec sa cible. Cependant, les fluorophores organiques NIR ont un nombre élevé d'insaturations (entre 7 et 10 pour une émission à 700 nm²²), ce qui augmente leur poids moléculaire et leur hydrophobicité.

■ **Agrégation.** Les fluorophores organiques sont généralement constitués d'un système aromatique plan favorisant les interactions intermoléculaires comme le " π -stacking". De ce fait, ils ont tendance à s'empiler et à former des agrégats qui ne sont pas fluorescents. Les fluorophores organiques présentent classiquement des rendements quantiques de fluorescence plus faibles en solution aqueuse qu'en solvant organique à cause de ces phénomènes d'agrégation.

2.1.3 Propriétés pharmacocinétiques

■ **Toxicité.** Le marqueur ne doit pas être toxique vis-à-vis de l'organisme. La métabolisation du marqueur doit être minimale et les métabolites résultants ne doivent pas être toxiques vis-à-vis de l'organisme.

■ **Élimination.** Le marqueur doit être éliminé naturellement par l'organisme. Deux voies d'excrétion sont possibles : le foie et les reins. L'élimination rénale, qui concerne les molécules de taille inférieure à 5 nm et hydrosolubles, est généralement préférée car elle est la plus rapide.³⁷ De plus, la voie hépatique présente le risque de réabsorption du marqueur dans l'organisme (voie entéro-hépatique) qui peut conduire à sa métabolisation. La structure du marqueur, et plus particulièrement le nombre et la disposition de charges autour de celui-ci, influe fortement sur son mode d'élimination dans l'organisme.³⁵ L'élimination (ainsi que la métabolisation) diminue le temps de demi-vie du marqueur dans l'organisme (temps nécessaire à l'élimination de la moitié de la dose de marqueur injectée). Ce temps de demi-vie doit cependant être suffisamment grand pour permettre la liaison du vecteur avec sa cible.

■ **Affinité et spécificité.** Le marqueur doit posséder une bonne spécificité vis-à-vis de sa cible afin de limiter au maximum le bruit de fond. L'unité de reconnaissance doit présenter une certaine affinité vis-à-vis de sa cible pour permettre la reconnaissance. Cependant, cette affinité ne doit pas être trop élevée afin de permettre l'élimination du marqueur par l'organisme.

Les propriétés requises pour les marqueurs fluorescents spécifiques des tumeurs sont donc complexes et multiples. L'approche consiste à moduler la structure du marqueur afin d'obtenir le meilleur compromis possible entre toutes ces contraintes. Le choix du fluorophore joue ici un rôle prépondérant. Nous allons maintenant présenter une liste non exhaustive des fluorophores NIR organiques potentiellement utilisables pour des applications en imagerie par fluorescence *in vivo*.³⁸ Les BODIPY qui font l'objet

de cette thèse seront abordés plus en détail, nous présenterons notamment certains outils synthétiques permettant de fonctionnaliser ces fluorophores pour des applications en imagerie. Il est à noter que les fluorophores inorganiques (Quantum Dots et complexes organométalliques) ne seront pas abordés dans cette partie.³⁹⁻⁴²

2.2 Fluorophores organiques NIR pour l'imagerie in vivo.

2.2.1 Les cyanines

Les cyanines sont une famille de fluorophores appartenant au groupe des polyméthines où deux atomes d'azote sont liés par une chaîne carbonée insaturée (polyméthine). Chaque atome d'azote fait indépendamment partie d'un fragment hétérocyclique dont la nature (indole, quinoléine, isoquinoléine, benzothiazole...) joue un rôle important dans les propriétés photophysiques et physico-chimiques du fluorophore. De plus, c'est *via* la substitution de ces atomes d'azote que la post-fonctionnalisation de ces molécules est possible. En comparaison avec les autres familles de fluorophores, il est relativement facile d'obtenir des cyanines absorbant et émettant dans le proche infra-rouge sans augmenter drastiquement la taille de leur système aromatique et donc leur caractère hydrophobe. En effet, chaque motif vinyène (CH=CH) de la chaîne carbonée permet un décalage bathochrome d'environ 100 nm des maxima d'absorption et d'émission.⁴³ En comparaison, l'ajout d'un cycle aromatique à six atomes sur les parties latérales des cyanines conduit à un déplacement bathochrome de seulement 20 à 30 nm⁴⁴ (cf Figure 18).

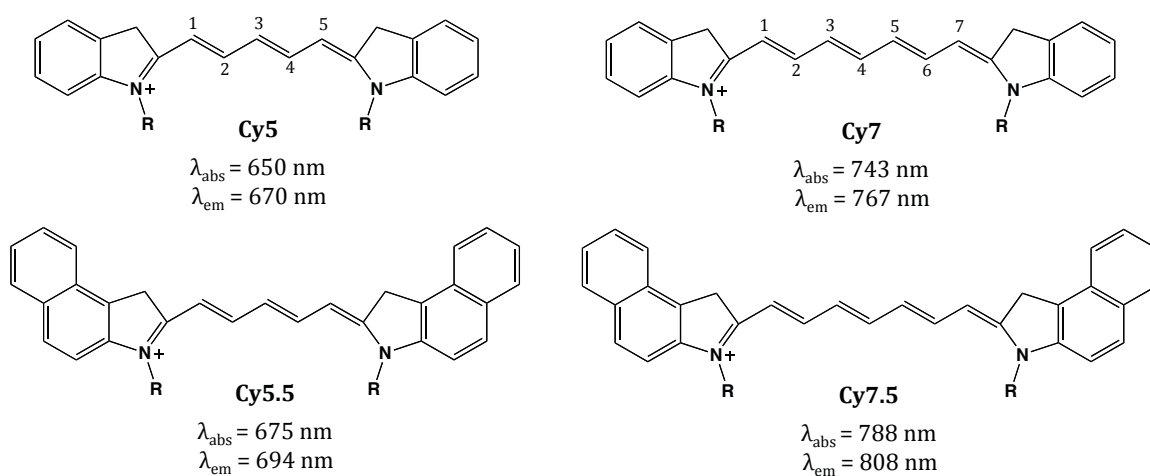


Figure 18 : maxima d'absorption et d'émission de cyanines NIR.

Contrairement aux fluorophores de type xanthène, les propriétés photophysiques des cyanines sont indépendantes du pH. Il est possible de les solubiliser dans l'eau par introduction d'un groupement sulfonate sur chacun des deux hétérocycles. Ces groupements sulfonate jouent un rôle primordial pour limiter les phénomènes d'agrégation en solution aqueuse, et donc pour conserver une partie de la fluorescence observée en solvant organique.

Ces propriétés font des cyanines des fluorophores bien adaptés à l'imagerie *in vivo*. Le vert d'indocyanine (ICG pour indocyanine green) est actuellement le fluorophore NIR le plus utilisé en imagerie par fluorescence *in vivo* tant sur le petit animal que sur l'humain (Figure 19).⁴⁵ L'ICG dispose d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) autorisant son utilisation au stade clinique.²²

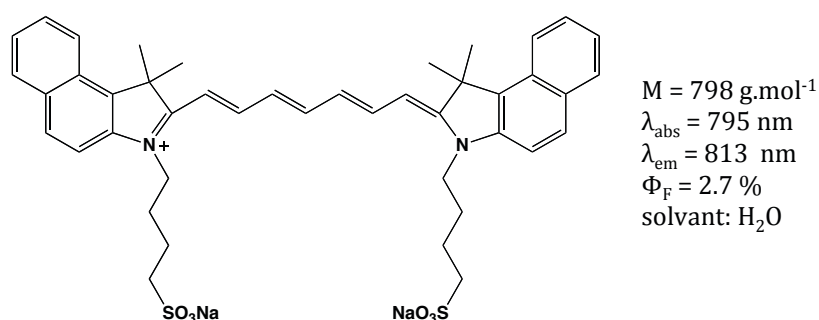


Figure 19 : structure et propriétés optiques du vert d'indocyanine (ICG).⁴⁶

Les principales limites des cyanines proviennent de la trop grande flexibilité de la chaîne polyméthine. Elle favorise tout d'abord des processus de désexcitation non radiatifs, ce qui conduit à des rendements quantiques relativement bas. Les mouvements de rotation et de torsion de cette chaîne induisent également une plus forte sensibilité aux phénomènes de dégradation chimique et photochimique (photoblanchiment).⁴⁷ Des travaux ont visé à rigidifier la structure en introduisant un fragment de type cyclopentène ou cyclohexène au milieu de la chaîne polyméthine.⁴⁸ D'un point de vue synthétique, la synthèse de cyanines dissymétriques s'avère compliquée. Elle passe généralement par la fonctionnalisation du bras polyméthine.

2.2.2 Les squaraines

Les squaraines sont des fluorophores de la famille des polyméthines, contenant un cœur hydroxyoxocyclobutène porteur de groupements électro-donneurs.⁴⁹ Le principal avantage des squaraines est leur large et intense bande d'absorption dans le rouge et le proche infra-rouge ($> 200000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), et leur bande d'émission généralement au dessus de 650 nm, dépendamment des cycles aromatiques adjacents au cœur oxabutène. Les applications de ces fluorophores ont longtemps été limitées en

raison de leur forte tendance à s'agréger dans les solvants polaires, mais aussi de par le caractère électro-déficient du cœur hydroxyoxocyclobutène le rendant sensible aux réactions avec des nucléophiles, notamment en milieu biologique.⁵⁰ En 2009, le groupe de Bradley D. Smith a réalisé une découverte qui a suscité un regain d'intérêt pour ces composés.⁵¹ Il a été montré que l'assemblage supramoléculaire de type rotaxane entre une squaraine et un macrocycle de type lactame limite les phénomènes d'aggrégation et rend le fluorophore inerte vis-à-vis des nucléophiles en solution sans changer drastiquement ses propriétés photophysiques. Une série de squaraines rotaxanes hydrosolubles avec des rendements quantiques de fluorescence de l'ordre de 20 % a par la suite été synthétisée par ce même groupe.⁵²

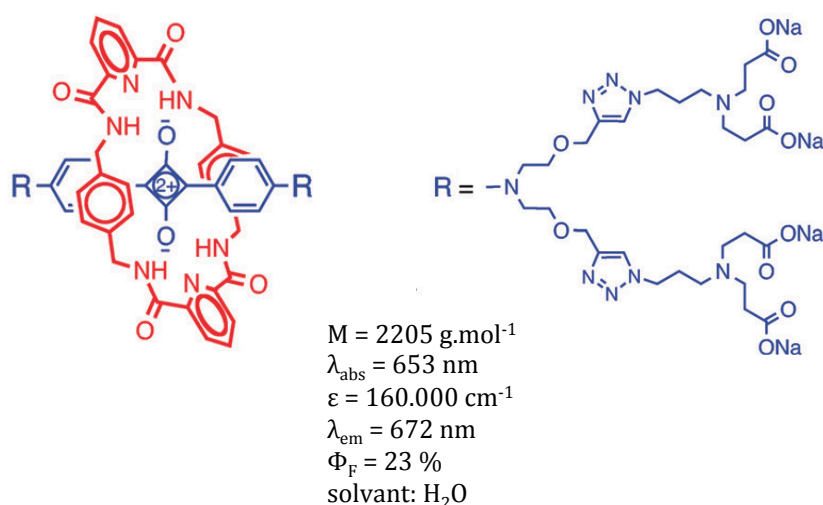


Figure 20 : structure et propriétés optiques d'un squaraine rotaxane.⁵²

2.2.3 Les xanthènes

Les xanthènes sont constitués d'un cycle pyrane entouré de deux cycles benzéniques. Ils sont à la base de deux catégories importantes de fluorophores : la fluorescéine et ses dérivés, et les rhodamines.

■ **La fluorescéine.** La fluorescéine est le fluorophore qui a été le plus largement utilisé en recherche biomédicale. La fluorescéine est peu soluble dans l'eau, mais sa forme disodique est totalement hydrosoluble. Ces fluorophores possèdent, dans l'eau, des propriétés particulières qui constituent plutôt une limite pour des applications en imagerie médicale : la fluorescéine présente sept formes prototropiques différentes dans l'eau, ses propriétés photophysiques sont donc dépendantes du pH (cf Figure 21).⁵³ Deux autres limitations majeures de la fluorescéine sont sa sensibilité

relativement élevée au photoblanchiment, et ses longueurs d'onde d'absorption et d'émission inférieures à celles de la fenêtre thérapeutique.

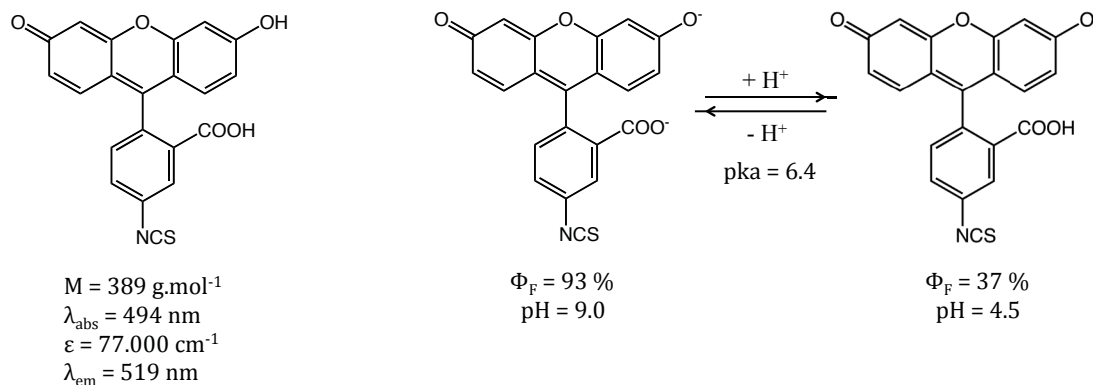


Figure 21 : structure et propriétés photophysiques de la fluorescéine isothiocyanate (FITC) en fonction du pH.⁴⁷

Notons que l'introduction de cycles benzéniques sur le squelette xanthène permet un décalage bathochrome des longueurs d'onde d'absorption et d'émission ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 595/660 \text{ nm}$ pour les naphthofluorescéines)⁵⁴, mais ces fluorophores ne sont luminescents que dans des conditions basiques. Pour pallier ces insuffisances, le groupe de Nagano a récemment exploré une voie alternative et prometteuse en substituant l'atome d'oxygène du cœur xanthène par un atome de silicium di-Me afin de déplacer les maxima d'absorption et d'émission vers le rouge (Schéma 1).⁵⁵

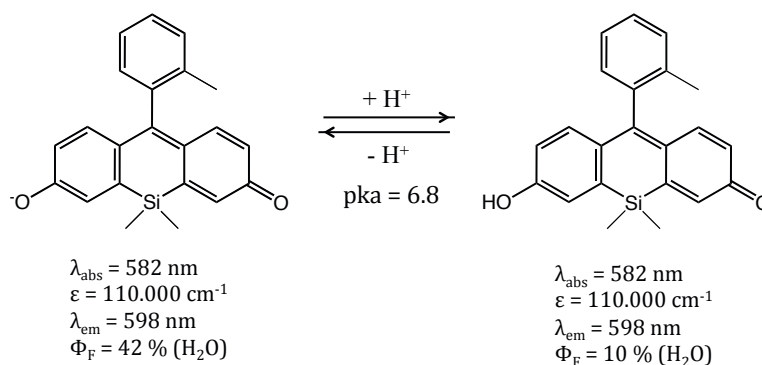


Schéma 1

■ **Les rhodamines.** Comme pour les dérivés de la fluorescéine, la polarité du solvant, le pH et la température influencent l'intensité de fluorescence des rhodamines, en activant ou en désactivant des processus de conversion interne.⁵⁶ Ces propriétés sont notamment utilisées afin d'élaborer des fluorophores activables/désactivables par liaison avec leur cible (Targeted-Cell-Specific Activation) ou par interaction/réaction

avec des enzymes ou des analytes.^{7,8} De nombreux travaux décrivent des méthodes pour rendre les rhodamines hydrosolubles⁵⁷ et décaler leurs domaines d'absorption dans le rouge lointain.⁵⁸ Des approches similaires à celles décrites précédemment pour les dérivés de la fluorescéine, visant à remplacer l'atome d'oxygène par un motif SiMe₂, ont par exemple été rapportées. Elles permettent d'obtenir des maxima d'émission au delà de 700 nm.⁵⁹ La nature des substituants portés par les rhodamines peut dans certains cas altérer fortement les propriétés d'émission de ces fluorophores. Des rhodamines hydrosolubles, présentant une forte fluorescence dans le rouge lointain, et possédant une large gamme de fonctions réactives ont cependant été récemment rapportées.⁶⁰ Un exemple est donné dans la Figure 22. Notons enfin que les rhodamines possèdent une bonne photostabilité en comparaison aux autres familles de fluorophores.⁷

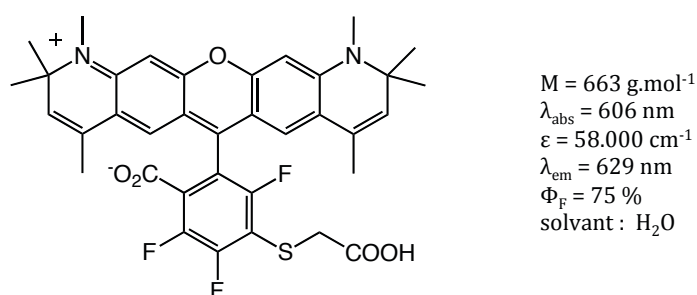


Figure 22 : dibenzorhodamine développée par le groupe de Stefan W. Hell.⁶⁰

2.2.4 Porphyrines et phtalocyanines

Les porphyrines sont des macrocycles aromatiques composés de quatre sous-unités pyrroliques connectées par quatre ponts méthine. La cavité centrale peut complexer un métal, ce qui a pour effet de moduler ses propriétés rédox et optiques. Les porphyrines présentent une intense bande d'absorption autour de 400 nm ($\epsilon > 100000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et une série de bandes moins intenses entre 500 et 650 nm. La présence d'un métal dans la cavité centrale et sa nature définissent le nombre, la longueur d'onde et l'intensité de ces bandes d'absorption. Leur longueur d'onde d'émission dans le rouge (autour de 650 nm) est faiblement intense, les rendements quantiques de fluorescence dépassant rarement 15 %.⁶¹ De plus, les porphyrines sont naturellement présentes dans les tissus biologiques (hème de l'hémoglobine, cytochromes et enzymes catalysant des réactions d'oxydo-réduction). Leur utilisation comme agent de contraste *in vivo* pose donc de réelles difficultés pour discriminer le bruit de fond généré par l'autofluorescence des dérivés porphyriniques endogènes du signal émis par le marqueur fluorescent. Des porphyrines modifiées présentant des propriétés optiques mieux adaptées à l'imagerie *in vivo* ont donc été développées.

■ **Hydroporphyrines.** La saturation partielle des unités pyrrole des porphyrines conduit à la formation des chlorines (réduction d'une insaturation), des bactériochlorines (réduction de deux insaturations sur deux unités pyrrole opposées) et des isobactériochlorines (réduction de deux insaturations sur deux unités pyrrole adjacentes), comme le montre la Figure 23. Les chlorines et bactériochlorines présentent des caractéristiques spectrales favorables pour des applications optiques *in vivo* et ont d'ailleurs été utilisées pour l'imagerie de tumeurs.^{62,63} Leurs longueurs d'onde d'absorption sont décalées dans le proche infrarouge (700-900 nm). Leur émission de fluorescence se caractérise par une bande d'émission relativement fine et intense, et par des rendements quantiques de fluorescence plus élevés que ceux de leurs analogues porphyriniques (environ 15 % pour les bactériochlorines et 25 % pour les chlorines).^{64,65} Afin d'empêcher l'oxydation des positions saturées, des groupements alkyles géminés sont généralement introduits sur les unités pyrrole.^{66,67}

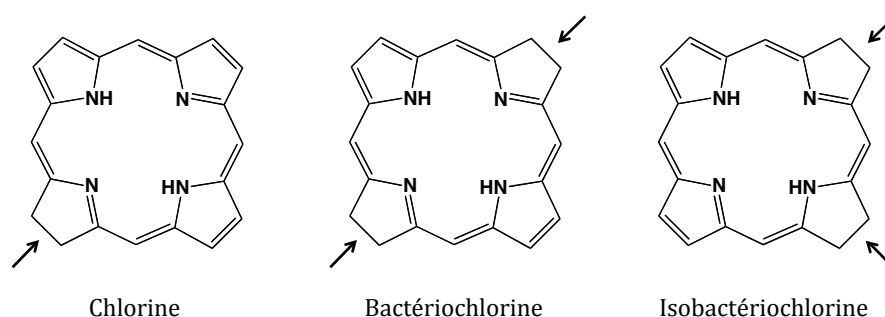
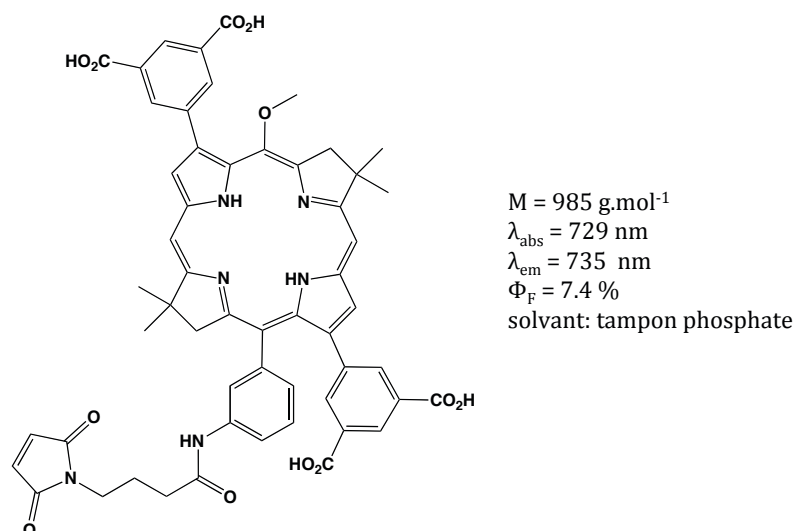
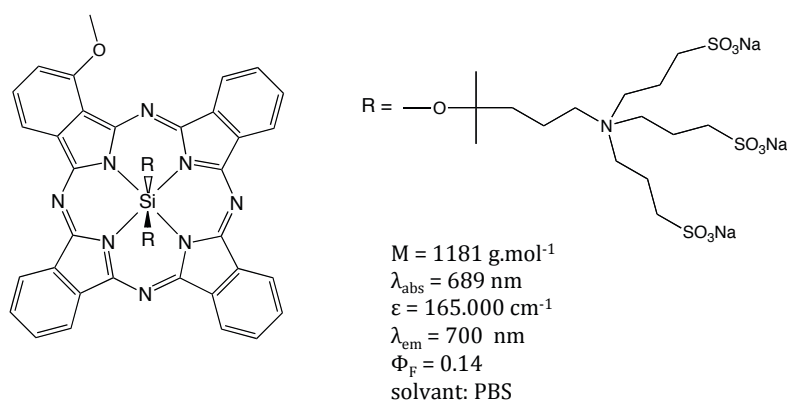


Figure 23 : structure des hydroporphyrines. Les flèches indiquent les insaturations réduites.

Les hydroporphyrines possèdent cependant plusieurs limitations, dont un faible déplacement de Stokes (généralement inférieur à 5 nm) et une hydrophobicité caractéristique des dérivés porphyriniques. Il est aussi important de noter que les voies synthétiques permettant l'accès à ces composés restent actuellement complexes. Il s'agit généralement de synthèses multi-étapes qui s'accompagnent de faibles rendements globaux de réaction. Soulignons les travaux très récents du groupe de Lindsey qui, au terme d'une synthèse de 13 étapes et d'un rendement total de 0.24 %, a pu isoler une bactériochlorine hydrophile et possédant une fonction réactive pour la bioconjugaison (Figure 24).

Figure 24 : *bactériochlorine synthétisée par Jiang et al.*⁶⁸

■ **Phtalocyanines.** Les phtalocyanines sont des dérivés de benzoporphyrines dont les atomes de carbone pontant entre les unités pyrroliques sont remplacés par des atomes d'azote. Contrairement aux porphyrines, elles possèdent de hauts rendements quantiques (particulièrement les phtalocyanines d'aluminium et de silicium). Leur émission se situe dans le rouge, autour de 700 nm. Afin de limiter leur tendance à l'agrégation, des groupements encombrants et hydrophiles peuvent être introduits sur la position apicale du macrocycle⁶⁹, comme c'est le cas pour l'IRDye 700DX[®] (Figure 25).

Figure 25 : *structure et propriétés optiques d'une phtalocyanine commercialisée par LI-COR (IRDye 700DX[®]).*⁷⁰

La forte délocalisation électronique du système aromatique des phtalocyanines leur confère une grande photostabilité. Ces fluorophores sont également connus pour leur forte cytotoxicité. En effet, comme tous les macrocycles tétrapyrroliques, les phtalocyanines sont d'excellents photosensibilisateurs : elles ont une forte tendance à

générer de l'oxygène singulet suite à une irradiation lumineuse (cf Figure 9). Cette propriété est particulièrement utile pour la thérapie photodynamique (PDT pour PhotoDynamic Therapy), de nombreux travaux relatent d'ailleurs l'utilisation de phtalocyanines pour le traitement de cancers par PDT.^{69,71,72} Pour des applications en imagerie *in vivo*, la cytotoxicité du fluorophore peut constituer une limite. A ce sujet, il faut remarquer que les concentrations en fluorophore requises pour la PDT sont supérieures à celles nécessaires pour l'imagerie, et que l'irradiation lumineuse est plus longue et plus intense en PDT. La production d'oxygène singulet n'en reste pas moins une source de toxicité vis-à-vis des tissus, ainsi qu'un processus de désexcitation du fluorophore concurrent à l'émission de fluorescence (quenching). Pour des applications en imagerie, il est donc nécessaire d'optimiser le design de ces fluorophores afin de limiter la production d'oxygène singulet.⁷³

Une des principales limites de ces fluorophores réside justement dans la difficulté à les synthétiser et à les fonctionnaliser. En plus d'être hydrophobes, ils sont peu solubles dans les solvants organiques, ce qui complique leur purification. Enfin, le peu de méthodes décrites pour la synthèse et la dérivatisation de ces composés offre assez peu de flexibilité synthétique.³⁸

2.2.5 Les BODIPY

2.2.5.1 Généralités

BODIPY est une marque déposée par la société Invitrogen-Molecular Probes et désigne les dérivés du 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazaindacène ou **BO**ro**DIPY**rrométhène dont la structure générale est représentée dans la Figure 26. La numérotation suit celle de l'indacène et la position 8 du BODIPY est souvent nommée *meso* en référence à son homologue porphyrine. La première synthèse de cette classe de composés fut décrite en 1968 mais ce n'est qu'à la fin des années 1980 qu'une attention particulière a été portée à ces composés. Les BODIPY font partie de la famille des cyanines et peuvent être considérés comme des dérivés monométhines rigidifiés *via* un motif complexant BF₂. Cette structure moléculaire permet d'obtenir certaines caractéristiques photophysiques des cyanines ($\epsilon > 50000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) tout en améliorant les rendements quantiques ($\Phi_F > 70 \%$). Ceci est dû à la rigidification de la structure qui défavorise les processus de désexcitation non-radiative.³⁸ Cette rigidification permet également aux BODIPY d'être plus stables chimiquement, et de mieux résister à certaines conditions synthétiques que les cyanines. La post-fonctionnalisation des BODIPY est donc plus aisée, d'autant plus qu'ils disposent de plusieurs positions réactives (cf Figure 26). Ajoutons que la position *meso* permet de réaliser aisément une monofonctionnalisation.

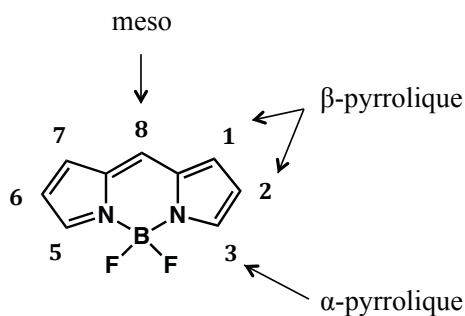
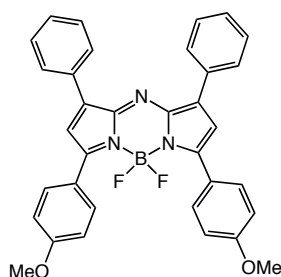


Figure 26 : structure de base d'un Bodipy

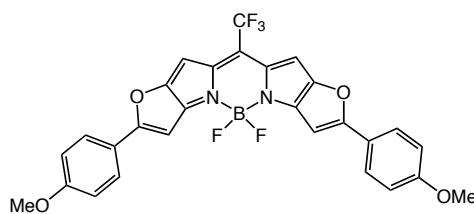
Les larges possibilités synthétiques qu'offrent les Bodipy permettent leur utilisation dans de nombreux domaines, principalement pour l'opto-électronique, la détection de divers analytes et dans le domaine du marquage biologique.⁷⁴⁻⁷⁶ Les principales limites des Bodipy pour des applications en imagerie médicale sont leur hydrophobicité⁷⁷ et leurs longueurs d'onde d'absorption et d'émission hors de la fenêtre thérapeutique. Des méthodes de post-fonctionnalisation permettent cependant de pallier ces limitations.

2.2.5.2 Post-fonctionnalisation des BODIPY pour des applications en imagerie

■ **Décalage des longueurs d'onde d'absorption et d'émission vers le proche infra-rouge.** Plusieurs stratégies ont été décrites dans la littérature pour élaborer des BODIPY NIR. Comme pour les autres fluorophores organiques, elles portent sur l'enrichissement électronique du système π -conjugué et passent par l'introduction de groupements électro-donneurs^{78,79}, le remplacement du carbone méso par un atome d'azote (aza-BODIPY)^{80,81}, la fusion avec des groupements aryles⁸²⁻⁸⁴, ou par la fusion de deux fragments indacène^{85,86} (cf Figure 27).

Tétraaaryl aza-BODIPY⁸¹

$M = 557 \text{ g.mol}^{-1}$
 $\lambda_{\text{abs}} = 688 \text{ nm}$
 $\epsilon = 85.000 \text{ cm}^{-1}$
 $\lambda_{\text{em}} = 715 \text{ nm}$
 $\Phi_F = 0.36$
 solvant: CHCl_3

Keio Fluor (KFL-4)⁸⁷

$M = 552 \text{ g.mol}^{-1}$
 $\lambda_{\text{abs}} = 723 \text{ nm}$
 $\epsilon = 253.000 \text{ cm}^{-1}$
 $\lambda_{\text{em}} = 738 \text{ nm}$
 $\Phi_F = 0.56$
 solvant: CHCl_3

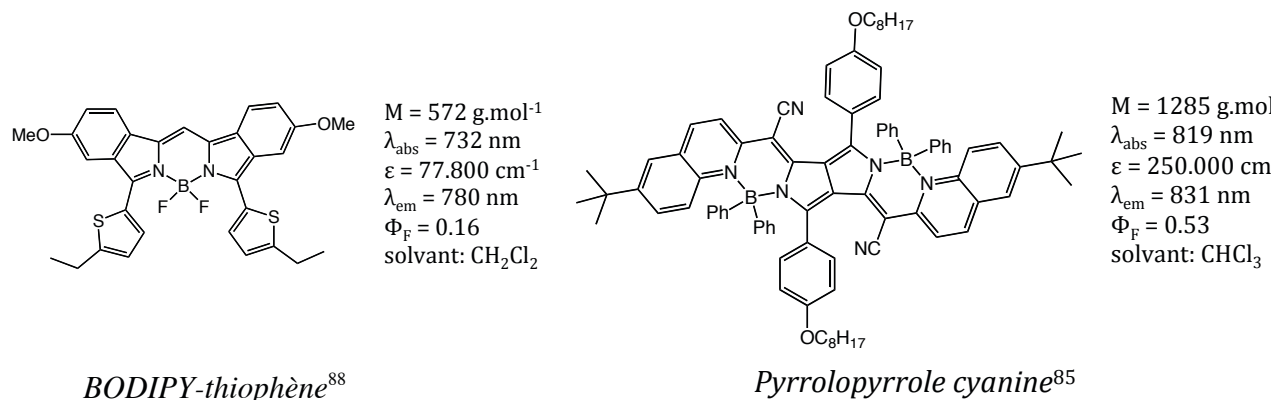
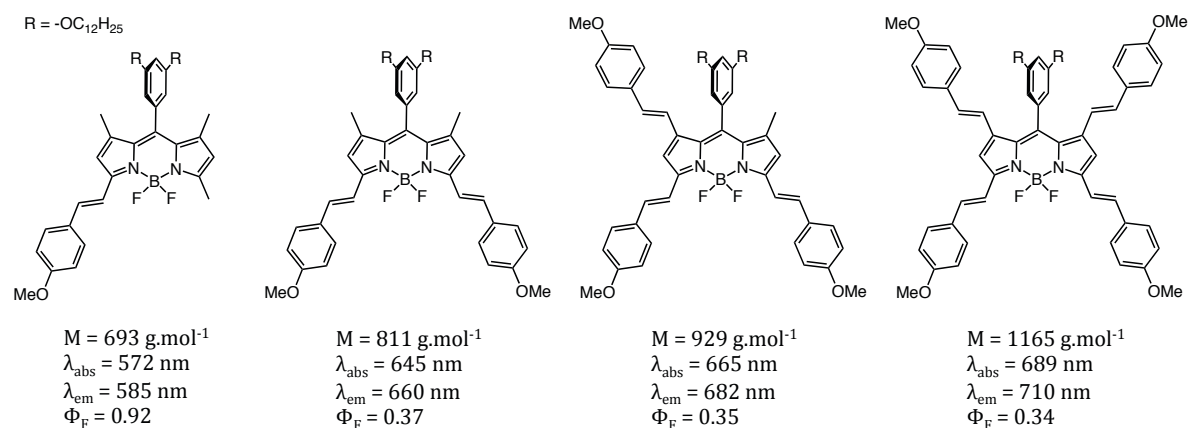
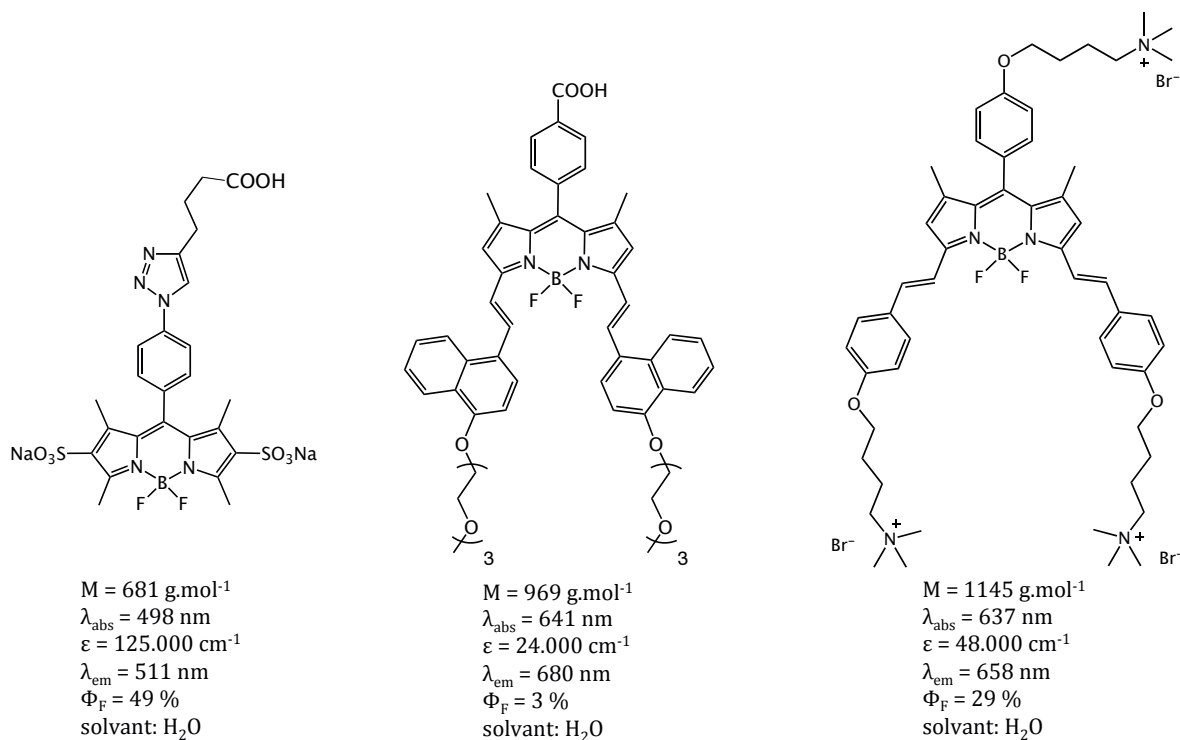


Figure 27 : Principaux BODIPY NIR.

D'autres méthodes portent sur l'extension du système π -conjugué par introduction de groupements styryle.^{89,90} Notons que l'ajout de deux groupements styryle (BODIPY distyryle) permet un décalage des longueurs d'onde de plus de 100 nm, contre 50 nm seulement pour deux groupements styryle supplémentaires (cf Figure 28).

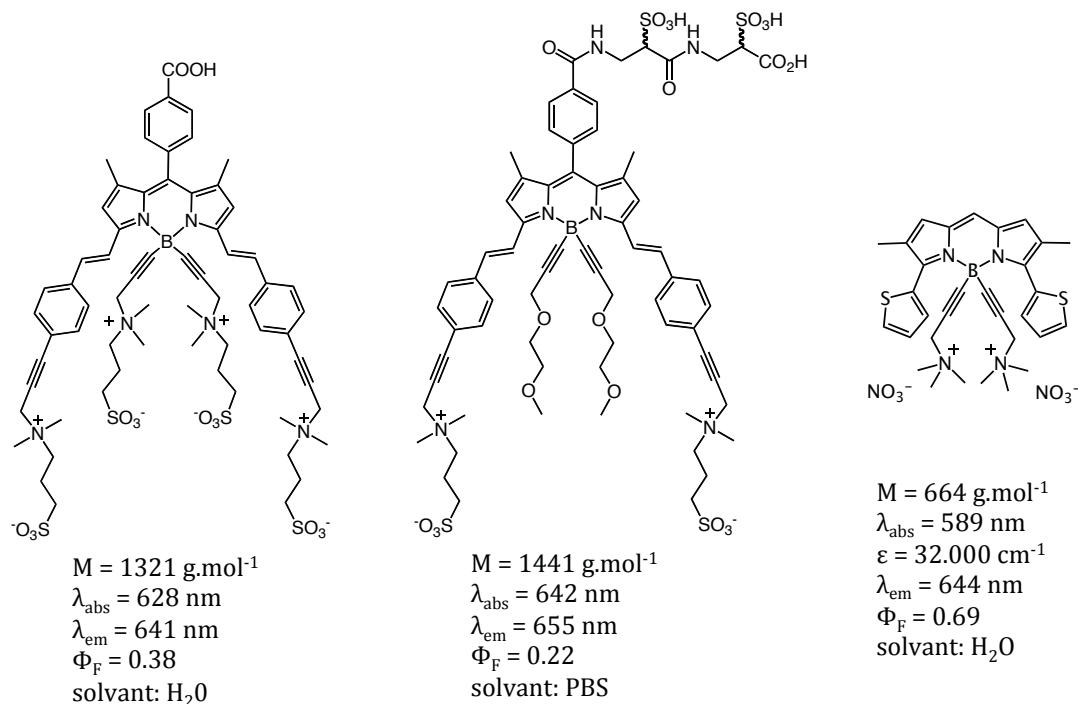
Figure 28 : BODIPY mono-, di-, tri- et tétrastyryle.⁹¹

■ **Hydrosolubilisation.** Les deux stratégies les plus employées pour solubiliser les BODIPY dans l'eau sont l'introduction de groupements polyéthylène glycol (PEG), et l'ajout de groupements sulfonates (Figure 29).

Figure 29 : structure de différents BODIPY hydrosolubles.⁹²⁻⁹⁴

Notons que les groupements polyéthylène glycol augmentent la solubilité du fluorophore dans l'eau, mais aussi dans certains solvants organiques comme le toluène ou le dichlorométhane, ce qui peut compliquer les étapes de purification. En revanche, leur encombrement stérique est un moyen de limiter l'agrégation du fluorophore dans l'eau.

■ **Limiter l'agrégation.** Comme la plupart des fluorophores organiques, les BODIPY ont tendance à s'agréger dans l'eau de part leur structure aromatique plane. Ce phénomène est favorisé par le système π -conjugué étendu des BODIPY NIR. L'introduction de groupements encombrants orthogonaux au plan aromatique du BODIPY permet de limiter l'empilement. Le groupe de Ziessel a élaboré plusieurs BODIPY fonctionnalisés au niveau de l'atome de bore par formation de liaisons bore-carbone comme le montre la Figure 30. Des groupements polyéthylène glycol et sulfonate ont notamment été introduits.

Figure 30 : fonctionnalisation du bore pour limiter l'agrégation.⁹⁵⁻⁹⁷

2.3 Vectorisation des fluorophores

2.3.1 Accumulation de certains composés dans les tumeurs

La bioconjugaison du fluorophore consiste à le fonctionnaliser par une entité capable de reconnaître une cible biologique. On parle également de vectorisation vis-à-vis d'une cible. Avant de décrire les différents vecteurs permettant de cibler les tumeurs, nous allons faire quelques rappels sur le fonctionnement des cellules tumorales. Leur physiologie et leur métabolisme particuliers permettent en effet d'expliquer pourquoi certains composés ont la propriété de s'y accumuler.

Le cancer se caractérise par des cellules à la croissance incontrôlée et pouvant se reproduire à l'infini. Une cellule tumorale se divise plus rapidement que ses congénères saines. De ce comportement anormal des cellules résulte un amas de cellules tumorales, une tumeur. Tant que les cellules de cette tumeur restent rassemblées en une seule masse, on parle de tumeur bénigne. Une tumeur devient cancéreuse lorsqu'elle est maligne, c'est à dire lorsqu'elle produit des métastases ou qu'elle détruit des tissus adjacents. Ces cellules se détachent de la tumeur principale et transitent dans le corps via le système lymphatique et le réseau sanguin. Elles s'installent finalement dans un

autre organe où elles peuvent se développer en une nouvelle tumeur. D'un point de vue physiologique, les cellules tumorales diffèrent des cellules en plusieurs points.⁹⁸ Trois caractéristiques fondamentales peuvent être exploitées afin de cibler les tumeurs :

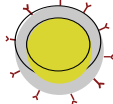
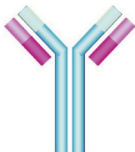
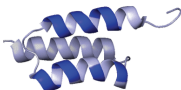

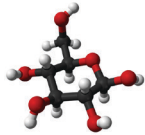
- **Une hypervascularisation des tissus tumoraux.** Les tumeurs sont irriguées par un système vasculaire anormalement développé qui permet notamment d'augmenter l'apport en nutriments et de favoriser la transmission des facteurs de croissance et des métastases. L'hyperprolifération cellulaire au sein de la tumeur, associée à un faible drainage lymphatique et à une perméabilité accrue de la paroi vasculaire favorise l'accumulation de particules de haut poids moléculaire. On parle d'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention). Cette propriété permet l'accumulation de nanoparticules de 100 à 200 nm au niveau des tumeurs.⁹⁹

- **Une consommation excessive de certains nutriments.** La majorité des cellules tumorales développent un métabolisme particulier, permettant une croissance rapide et nécessitant un apport important d'énergie, de vitamines et d'acides aminés. Certains oses entrant dans le métabolisme des glucides, le glucose principalement, mais aussi le fructose et le galactose sont utilisés afin de cibler les tumeurs car elles en consomment plus que les cellules saines. Selon le même principe, des vitamines comme le folate (vitamine B9) ou la biotine (vitamine B8) peuvent être utilisées. Ces composés appartenant à la famille des petites molécules peuvent généralement traverser rapidement les membranes biologiques (de manière active ou passive) afin d'être assimilés par la cellule.¹⁰⁰

- **Une surexpression de certains récepteurs membranaires.** Les cellules tumorales prolifèrent de manière anormalement rapide. C'est l'hyperactivité des oncogènes (gènes mutés) qui active cette prolifération en rompant l'équilibre entre stimulation et frein de la division cellulaire. Ces oncogènes codent de manière intensive pour des protéines jouant un rôle dans la croissance, la multiplication et la survie de la cellule. Parmi ces protéines, il y a des récepteurs membranaires permettant la détection spécifique de certaines molécules, en particulier des hormones et des facteurs de croissance. Ces molécules peuvent être utilisées afin de cibler spécifiquement les tumeurs. Elles possèdent une grande diversité de taille : du simple peptide de quelques acides aminés à l'anticorps. Leurs propriétés pharmacocinétiques, leurs propriétés de liaison, et les voies d'accès et de modifications de ces composés dépendent fortement de leur taille.

Le Tableau 3 donne la gamme de taille, ainsi que les avantages et les inconvénients des principales unités de reconnaissance utilisées dans la littérature. Notons que la catégorie des nanomatériaux regroupe les nanoparticules, les quantum dots, les nanotubes, les liposomes, les micelles et les dendrimères¹⁰¹ et que la fonctionnalisation de leur surface utilise des unités de reconnaissance mentionnées dans les quatre autres catégories.

Tableau 3: propriétés des principales unités de reconnaissance.^{6,101}

Type de vectorisation	Taille	Avantages	Inconvénients
 Nanomatériaux	10-200 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Peut être fonctionnalisé par plusieurs unités de reconnaissance 	<ul style="list-style-type: none"> • Elimination lente, $t_{1/2}$ élevé • Toxicité si métaux lourds
 Anticorps	~150 kDa ~10 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Faible antigénicité • Faible toxicité • Haute spécificité • Beaucoup d'anticorps validés en pré-clinique 	<ul style="list-style-type: none"> • Elimination lente, $t_{1/2}$ élevé • Temps de liaison avec la cible élevé • Production et purification délicates
 Fragments d'anticorps	~5-10 kDa ~5 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Affinité et spécificité comparables à celles des anticorps et temps d'élimination réduit 	<ul style="list-style-type: none"> • Production et purification délicates
 peptides	~0.5-2 kDa ~1-4 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Haute spécificité • Faciles à synthétiser et à fonctionnaliser • Elimination rénale rapide, pas de rétention dans les tissus 	<ul style="list-style-type: none"> • $t_{1/2}$ faible • Influence du fluorophore sur les propriétés de liaison avec la cible
 Petites molécules	<0.5 kDa <1 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Bonne spécificité • Elimination rénale rapide dans le sang (mais rétention dans les tissus si internalisation dans les cellules) 	<ul style="list-style-type: none"> • Influence du fluorophore sur les propriétés de liaison avec la cible

2.3.2 Les peptides pour cibler les tumeurs

Les peptides sont de petites séquences d'acides aminés (jusqu'à vingt acides aminés). Ce sont généralement des équivalents synthétiques de molécules naturellement synthétisées par le corps et reconnues par des récepteurs membranaires surexprimés par les cellules cancéreuses. Les peptides de synthèse comportent généralement le site de reconnaissance du peptide naturel, mais également quelques

modifications visant à augmenter leur temps de demi-vie dans l'organisme. Ces modifications touchent certains acides aminés (chaînes latérales modifiées, inversion du centre de chiralité) et permettent essentiellement de limiter la métabolisation et la dégradation du peptide par des enzymes. Elles ne doivent pas altérer ses propriétés de liaison avec son récepteur-cible. La nature du peptide et de son récepteur-cible associé définissent le type de tumeur ciblée, comme le montre le Tableau 4. Notons enfin que la synthèse des peptides est largement facilitée par le développement des synthétiseurs peptidiques. Cela explique en grande partie leur large utilisation pour imager les zones tumorales.^{45,102}

Tableau 4: résumé des principaux peptides utilisés pour le ciblage des tumeurs et leurs récepteurs-cible associés.¹⁰³

Peptide	Récepteur-cible	Tumeur ou zone atteinte
Octréotide (OC)	SST ₂	Poumon, lymphome, paragangliome, cerveau, rein, thyroïde, syst. neuroendocrinien.
Bombésine (BBN)	GRPR	Prostate, poumon, pancréas, gastro-intestinal
RGD	Intégrine $\alpha_v\beta_3$	Gliome, poumon, prostate
Peptide vasoactif intestinal (VIP)	VPAC ₁	Poumon, prostate, estomac, foie, syst. neuroendocrinien
Cholécystokinine-8 (CCK-8)	CCK ₂	Poumon, thyroïde, ovaires, astrocytome, système gastro-intestinal
Neurotensine (NT)	NTR ₁	Poumon, colorectal, pancréas, méningiome, astrocytome, prostate
Cys-Glu et Lys-Glu ureas	PSMA	Prostate, métastases (néo-vaisseaux)

2.3.3 Fonctions de greffage pour la bioconjugaison

La bioconjugaison passe par l'introduction sur le marqueur d'une fonction capable de réagir spécifiquement avec une zone déterminée de la biomolécule (fonction de greffage). Afin de conserver de bonnes propriétés de reconnaissance du vecteur, la liaison avec le marqueur doit être réalisée hors de la zone de reconnaissance permettant la liaison du vecteur avec le récepteur-cible.

Nous allons décrire les techniques de bioconjugaison les plus utilisées, qui passent par le ciblage des amines primaires, des fonctions thiol des cystéines, ou de fonctions réactives non-naturelles introduites par modification chimique de certains acides aminés.¹⁰⁴

■ **Ciblage des amines primaires.** Elles constituent les cibles disponibles pour la bioconjugaison les plus nombreuses et les plus souvent visées.¹⁰⁵ On trouve des amines primaires sur l'extrémité N-terminale des peptides ainsi que sur les chaînes latérales des lysines. Les amines primaires présentent des réactivités variées avec nombre de fonctions de greffage. La méthode la plus simple consiste à réaliser un couplage peptidique avec un ester activé (Figure 31 A).

Les anhydrides cycliques peuvent également être utilisés. Ils possèdent une grande réactivité vis-à-vis des amines primaires (Figure 31 B). Ces dérivés sont cependant difficiles à isoler car ils s'hydrolysent facilement. Enfin, il faut citer les fonctions de greffage de type isothiocyanate très régulièrement utilisées pour la bioconjugaison. Ce groupement est moins sensible à l'hydrolyse que les anhydrides cycliques mais présente aussi une réactivité plus faible vis-à-vis des amines. Il est souvent nécessaire de chauffer légèrement ($\sim 37^\circ\text{C}$) afin de favoriser la formation de la liaison thiourée (Figure 31 C).

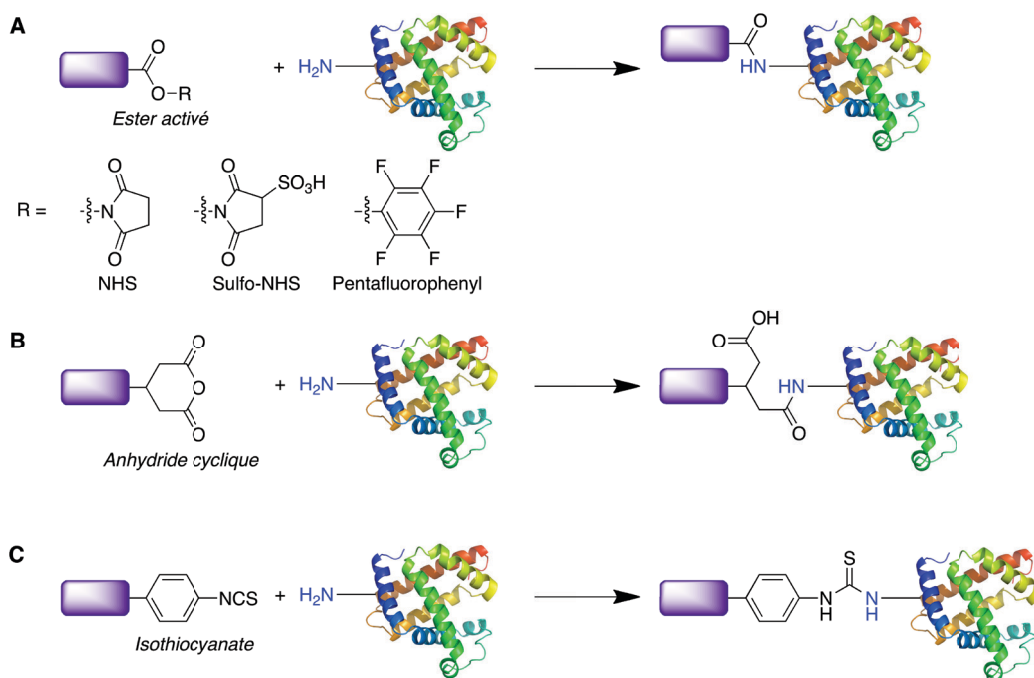


Figure 31 : principales fonctions de greffage spécifiques des amines primaires.

■ **Ciblage des fonctions thiol.** La cystéine est le seul acide aminé porteur d'une fonction thiol; elle participe à la formation de ponts disulfure. Les cystéines qui ne participent pas à la formation de ponts disulfure peuvent être ciblées par plusieurs

fonctions de greffage.¹⁰⁵ La plus utilisée d'entre elles est la fonction maléimide (cf Figure 32)

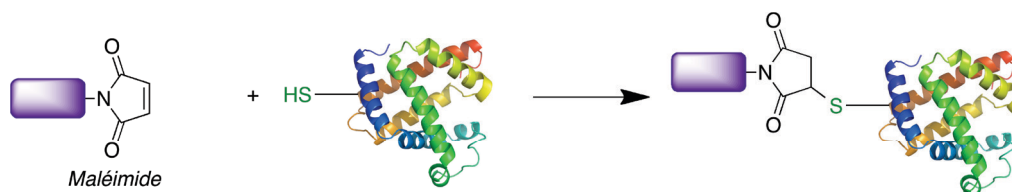


Figure 32 : la réaction entre une fonction maléimide et un thiol conduit à la formation d'une liaison thioéther.

■ **Ciblage d'acides aminés non naturels.** La modification chimique de certains acides aminés de la biomolécule permet d'obtenir un meilleur contrôle de la bioconjugaison. Les progrès réalisés dans le domaine de la synthèse peptidique permettent d'introduire facilement une fonction réactive non naturelle et chimiosélective. On parle alors de chimie bioorthogonale. L'exemple le plus représentatif constitue la fonctionnalisation de peptides par des fonctions azoture qui réagissent spécifiquement avec une fonction alcyne. La cycloaddition de Huisgen, réaction de « *chimie-click* » conduit à la formation de triazoles physiologiquement stables, avec de bons rendements, et peut être réalisée dans l'eau. La plupart du temps, elle est catalysée par du cuivre pour les alcynes vrais.¹⁰⁶ Des méthodes plus récentes utilisant un dérivé cyclooctyne ont également été mises au point (cf Figure 33).¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Le cyclooctyne est plus encombrant que l'alcyne vrai mais il présente l'avantage de réagir avec l'azoture sans catalyseur. Cette technologie est utilisée notamment pour le « pre-targeting ».¹¹⁰

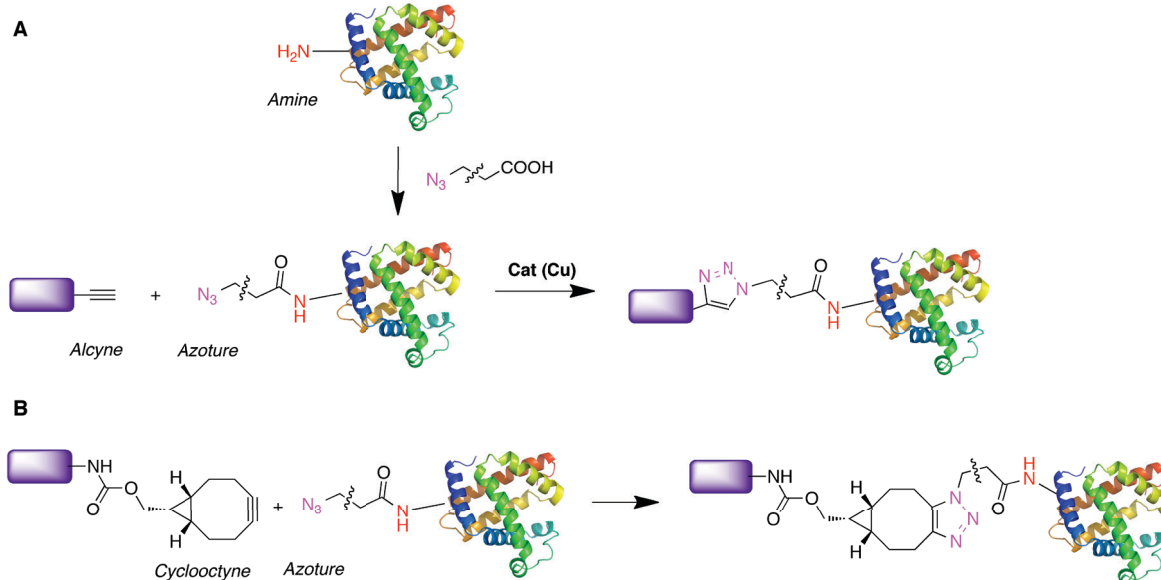


Figure 33 : bioconjugaison par réaction de « *chimie-click* ».

L'élaboration de nouveaux marqueurs fluorescents et l'optimisation de leurs propriétés permettent d'obtenir plus d'informations lors d'un examen par imagerie optique. Des approches récentes visant à combiner l'imagerie optique avec d'autres méthodes d'imagerie sont également un moyen d'affiner le diagnostic et d'obtenir des images plus précises et plus fiables de la zone d'intérêt. L'approche multimodale permet de cumuler les avantages de différentes méthodes d'imagerie et offre de nouvelles possibilités dans le diagnostic et le traitement de certaines pathologies. Dans la section suivante, nous aborderons les avantages apportés par les sondes bimodales permettant de coupler l'imagerie optique à l'imagerie nucléaire.

3 Vers une imagerie bimodale optique et nucléaire

La recherche en imagerie se concentre actuellement sur l'imagerie multimodale qui consiste à superposer les images de différentes techniques d'imagerie acquises au cours du même examen. Les examens TEP/CT couplant l'imagerie nucléaire à la tomodensitométrie en sont l'exemple le plus représentatif : ils sont couramment utilisés en clinique et permettent en un seul examen d'identifier les zones d'intérêt, notamment les zones cancéreuses.¹¹¹ Un important travail de recherche doit néanmoins être effectué pour l'élaboration et la mise au point de traceurs multimodaux efficaces. Une partie de ce travail de thèse consiste à élaborer des sondes bimodales permettant de coupler l'imagerie optique à l'imagerie nucléaire. Les contraintes techniques et financières associées à cette approche nécessitent cependant de bien définir quels sont les avantages qu'elle procurent, et quelles sont les applications visées. Ces aspects seront abordés dans ce chapitre, après avoir introduit le principe de l'imagerie nucléaire. Une revue de la littérature récente concernant l'élaboration de marqueurs utilisables en imagerie optique et nucléaire, et reconnaissant les cellules tumorales, sera ensuite présentée.

3.1 Généralités sur l'imagerie nucléaire.

L'imagerie nucléaire repose sur la vectorisation spécifique de radioéléments (radiotraceurs) administrés à un patient, dont le rayonnement permet d'obtenir des informations d'ordre fonctionnel ou métabolique sur un tissu ciblé (des tissus tumoraux dans le cas de l'oncologie). Toutes les méthodes d'imagerie nucléaire reposent sur un examen tomographique qui permet de reconstruire la biodistribution du radioélément en trois dimensions par superposition de coupes tomographiques, et par un traitement informatique. L'imagerie nucléaire est basée sur le principe de la scintigraphie et repose par conséquent sur la détection par une gammacamera de rayonnements gamma émis par un radionucléide. Ceux-ci possèdent un temps de demi-vie (durée au bout de laquelle l'activité spécifique du radioélément est diminuée de moitié) allant de quelques minutes à plusieurs jours. On distingue deux méthodes d'imagerie nucléaire, selon la nature des rayonnements émis par le radioélément.

La TEMP est sensible aux émetteurs de photons γ (en violet dans le Tableau 5). Ils sont détectés par l'intermédiaire d'une caméra à scintillation. Les photons γ ont une énergie variable (de 100 keV à 250 keV) en fonction de la nature du radioélément. (cf Tableau 5)

La TEP est sensible aux émetteurs de positons β^+ (en bleu dans le Tableau 5). Ce positon, après avoir effectué un parcours de 0.5 à 5 mm dans les tissus biologiques, s'annihile en rencontrant un électron de la matière environnante. Cette annihilation conduit à l'émission de deux photons γ d'énergie égale (511 KeV), chacun dans des directions diamétralement opposées.

Tableau 5: propriétés des principaux radioéléments utilisés en imagerie nucléaire.¹¹²

Radionucléides	Type de radiation	Temps de demi-vie	Energie d'émission γ (keV)	Type de production
^{11}C	β^+	20 min	511	cyclotron
^{18}F	β^+	110 min	511	cyclotron
^{64}Cu	β^+	12.7 h	511	cyclotron
^{67}Ga	γ	78 h	93, 185, 296	cyclotron
^{68}Ga	β^+	68 min	511	générateur
^{86}Y	β^+	14.7 h	511	cyclotron
^{89}Zr	β^+	78.5 h	511	cyclotron
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	γ	6 h	141	générateur
^{111}In	γ	67.2 h	173, 247	cyclotron
^{123}I	γ	13 h	159	cyclotron
^{124}I	β^+	100.8 h	511	cyclotron
^{201}Tl	γ	73.1h	68-800	cyclotron

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour choisir le radioisotope le plus adapté à un examen d'imagerie nucléaire :

- **L'énergie des photons émis.** En scintigraphie, l'énergie des rayons gamma émis peut varier de 80 à 500 keV suivant le type d'appareil utilisé (80 à 300 keV pour la TEMP, 511 keV pour la TEP). Des photons de plus faible énergie seraient trop atténués par les tissus, alors qu'une énergie trop importante rendrait le traitement des données plus difficile et conduirait à des images de moindre qualité.
- **Le temps de demi-vie.** Il correspond à la durée au bout de laquelle l'activité spécifique du radioélément est diminuée de moitié. Il doit être adapté à l'exploration pratiquée, soit suffisamment long pour permettre une fixation maximale du radiotraceur (et donc obtenir des images de qualité optimale), tout en étant suffisamment bref pour limiter l'irradiation du patient. Pour les radiotraceurs possédant une élimination rapide dans l'organisme (quelques minutes), un isotope à durée de vie courte sera privilégié. Inversement, les isotopes à durée de vie longue (supérieur à une journée) sont plutôt

adaptés au marquage des anticorps qui possèdent un temps de fixation à leur récepteur beaucoup plus long.

■ **Mode de production, coût et disponibilité.** La production des radioéléments représente une partie importante des dépenses engendrées par les méthodes d'imagerie nucléaire. La majorité des radioéléments couramment utilisés en imagerie nucléaire sont produits par un cyclotron. Un cyclotron est un accélérateur de particules générant des réactions nucléaires et permettant d'extraire certains radioéléments. C'est un dispositif lourd et coûteux qui doit si possible être intégré aux centres d'imagerie. Les isotopes au temps de vie de l'ordre de quelques minutes requièrent en effet une production à courte distance du centre utilisateur. Certains radioéléments peuvent être produits par un générateur. Une production par générateur est beaucoup plus avantageuse de par son prix de revient et sa facilité à être réalisée directement sur le lieu d'utilisation.

La majorité des radioéléments doivent être liés à un vecteur afin de s'accumuler dans la zone d'intérêt (cf 2.3.1). Le marquage radioactif du vecteur doit être rapide, particulièrement pour les radioéléments à demi-vie courte. Il existe deux méthodes de marquage.

■ **Marquage direct.** Dans un marquage direct, le radioisotope est directement fixé au vecteur. Certains isotopes (^{18}F , ^{123}I , ^{11}C) sont liés par liaison covalente. Cette approche présente l'avantage de modifier faiblement la structure du vecteur du fait du faible encombrement stérique. Il permet le marquage de molécules métabolisables ou de ligands de récepteur en conservant leur structure dans l'espace et leur activité biologique. Le fluorodésoxyglucose (^{18}F), par exemple, est un analogue radiopharmaceutique du glucose couramment utilisé comme traceur dans l'imagerie nucléaire des cellules cancéreuses.

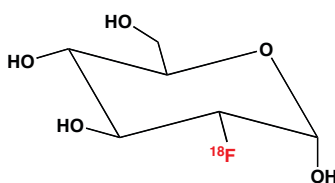


Figure 34 : structure du fluorodésoxyglucose (^{18}F FDG).

Des molécules plus grosses, notamment des anticorps peuvent également être marqués directement par complexation d'un radiométal, le technétium, par les groupements chélatants libres des chaînes latérales de certains acides aminés.¹¹³ Il est cependant difficile de prédire la quantité de marqueurs introduits sur le vecteur, ainsi que la stabilité des complexes formés. Notons que l'iode 123 , radioisotope de choix pour

l'imagerie médicale de la glande thyroïde, ne nécessite pas de liaison à un vecteur. En effet, l'iode est métabolisé dans la thyroïde, donc il s'y accumule naturellement.

■ **Marquage indirect.** Le marquage indirect permet de résoudre les problèmes liés à l'instabilité des macromolécules marquées par des radiométaux par voie directe. Le métal est alors encapsulé dans un ligand adapté pour éviter son relargage dans l'organisme. Le choix du ligand repose principalement sur la sélectivité de l'agent chélatant pour le métal et sur la stabilité thermodynamique et la cinétique de formation du complexe. De nombreux travaux ont permis de mettre au point des ligands permettant de complexer une grande diversité de radiométaux.^{114,115}

Le DTPA, par exemple, est le ligand permettant de chélater un atome de ^{111}In dans le complexe [^{111}In -DTPA-D-Phe¹]octreotide utilisé en routine en oncologie et commercialisé sous le nom d'Octréoscan® (cf Figure 35 B).¹¹⁶

D'autres ligands plus versatiles, les polyazacycloalcanes, présentent de bonnes propriétés de complexation des radiométaux. Ces polyamines cycliques varient de part la taille du cycle, mais aussi le nombre et la nature des « bras » coordinants portés par les atomes d'azote (cf Figure 35 A). Cette modularité permet d'adapter la structure des macrocycles à plusieurs sortes de radiométaux. Les groupes coordinants sur le macrocycle peuvent servir à augmenter la stabilité du complexe formé en complétant la sphère de coordination du métal, ou à fonctionnaliser le macrocycle pour la bioconjugaison (N-fonctionnalisation). Un exemple est donné dans la Figure 35 B : le [DOTA⁰, D-Phe¹, Tyr³] Octréotide, aussi appelé DOTATOC est un traceur formant des complexes stables avec le gallium 68 et l'indium 111 notamment, couramment utilisé pour l'imagerie des tumeurs neuroendocrines.¹¹⁷ Des utilisations en thérapie sont également possibles par métallation à l'yttrium 90.¹¹⁸

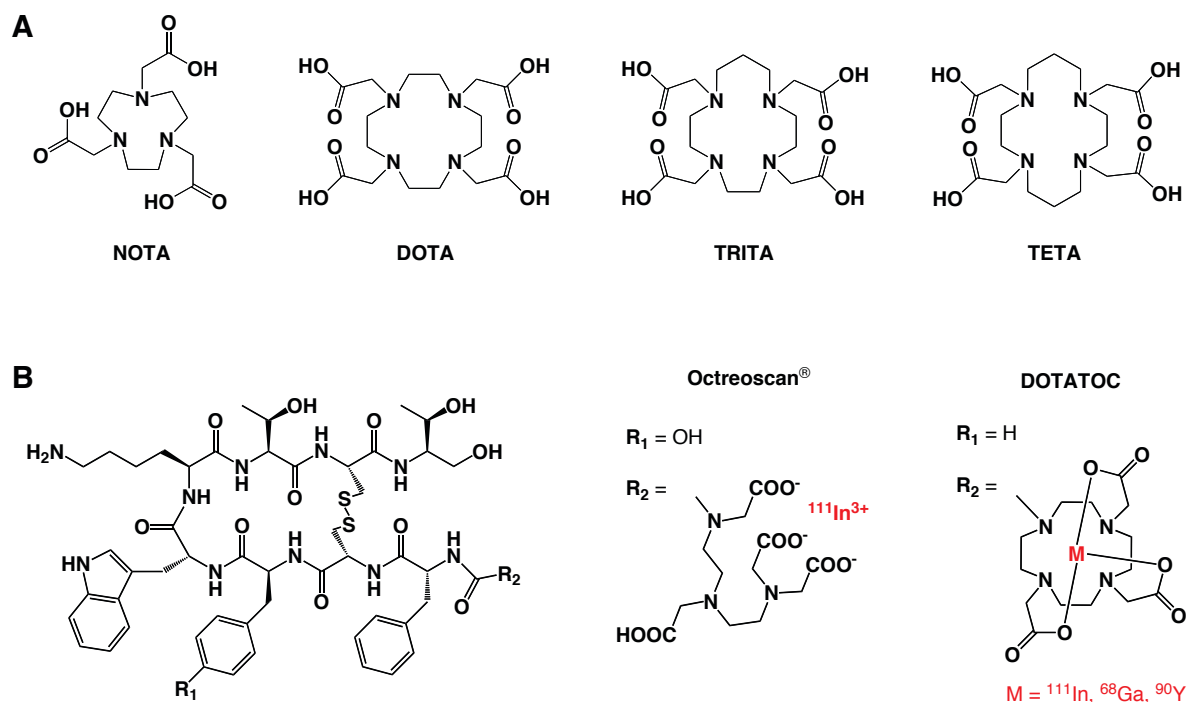


Figure 35 : principaux représentants de la famille des polyamines cycliques (A). Structure de l'Octreoscan® et du DOTATOC (métallé avec différents radiométaux) (B).

Cette partie décrivant le principe de l'imagerie nucléaire, permet également de mettre en évidence que l'utilisation des isotopes pour la détection des tumeurs est une méthode courante et bien au point. Des traceurs commerciaux sont utilisés en routine dans les centres d'imagerie et participent activement au diagnostic des cancers.

3.2 Apports de la bimodalité optique et nucléaire

L'imagerie optique et l'imagerie nucléaire sont des méthodes d'imagerie fonctionnelle qui permettent, via l'injection de traceurs vectorisés, de cibler et de détecter les foyers tumoraux. L'approche bimodale optique/nucléaire peut permettre de cumuler les avantages respectifs de ces deux approches. Le Tableau 6 résume les points forts et les points faibles de l'imagerie optique et de l'imagerie nucléaire. Notons que les valeurs précises concernant les performances de ces deux méthodes sont données dans le Tableau 1.

Tableau 6 : *avantages et inconvénients de l'imagerie optique et de l'imagerie nucléaire.*¹⁰¹

Modalité	Avantages	Inconvénients
Imagerie optique	<ul style="list-style-type: none"> - Non ionisante - Haute sensibilité - Haute résolution spatiale et temporelle - Quantitative (tomographie) - Faible toxicité 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible pénétration dans les tissus biologiques rendant certaines parties du corps inaccessibles
Imagerie nucléaire	<ul style="list-style-type: none"> - Haute sensibilité - Beaucoup de radiotraceurs approuvés pour l'humain et testés en clinique - Pénétrabilité illimitée à l'échelle du corps humain - Quantitative 	<ul style="list-style-type: none"> - Problèmes de radioprotection - Répétabilité limitée par la toxicité - Faible résolution spatiale et temporelle - Temps de demi-vie des radiotraceurs limité

Le couplage de l'imagerie nucléaire à l'imagerie optique constitue un moyen de pallier le manque de pénétrabilité de la lumière dans les tissus biologiques. Pour les zones peu profondes, qui peuvent être imagées par les deux méthodes, il est également possible d'améliorer la résolution d'images obtenues par la seule technique d'imagerie nucléaire. Cependant, les contraintes inhérentes à l'imagerie nucléaire, à savoir les risques toxiques des rayons ionisants et le temps restreint de demi-vie des radiotraceurs restreignent cette approche à certaines applications.

3.2.1 Applications cliniques et pré-cliniques.

Les applications de la bimodalité optique / nucléaire touchent à la fois le domaine préclinique et le domaine clinique.

Dans le domaine pré-clinique tout d'abord, l'utilisation de la bimodalité optique/nucléaire offre de nouvelles possibilités dans l'étude de l'évolution des cancers sur les petits animaux.¹¹⁹ La biodistribution de l'agent d'imagerie est déterminée par deux méthodes, donc plus précisément. Les suivis peuvent être effectués sur des échelles de temps plus longues que pour les examens d'imagerie nucléaire : la fluorescence est détectable plusieurs jours après l'injection de l'agent d'imagerie.¹²⁰ Des examens de microscopie de fluorescence *ex vivo* sur les organes peuvent être ensuite réalisés pour déterminer dans quels organes s'est accumulé le traceur.¹²¹ Ces examens d'imagerie préclinique sont également un moyen de validation d'agents d'imagerie

destinés à être utilisés pour l'imagerie intraopératoire sur l'humain (résection de tissus contaminés).¹²²

L'assistance à la chirurgie constitue une application majeure des agents bimodaux optique / nucléaire dans le domaine clinique. Les travaux réalisés par l'équipe du P. van Leeuwen en 2011 sont basés sur l'utilisation de ce type de systèmes pour assister l'exérèse de ganglions lymphatiques contaminés chez 11 patients atteints du cancer de la prostate. Pour rappel, le système lymphatique est une voie de transit importante des métastases. Des particules nanocolloïdales marquées au technétium ^{99m}Tc et au vert d'indocyanine sont d'abord injectées dans la prostate du patient. Le traceur circule dans le système lymphatique et s'accumule dans les ganglions lymphatiques. Ces ganglions sont alors localisés par un examen TEMP/CT préopératoire. L'ablation des ganglions est ensuite réalisée par le chirurgien, et assistée par imagerie par fluorescence peropératoire. Les ganglions excisés sont analysés au cours de l'opération par microscopie de fluorescence *ex vivo* afin de déterminer s'ils présentent des métastases ou non. Le chirurgien peut décider de réaliser un curage axillaire (retrait des ganglions en aval du ganglion sentinelle) si le résultat est positif. Des examens de microscopie de fluorescence sont également réalisés sur la prostate après l'opération afin d'évaluer précisément le stade de développement du cancer (Figure 36).

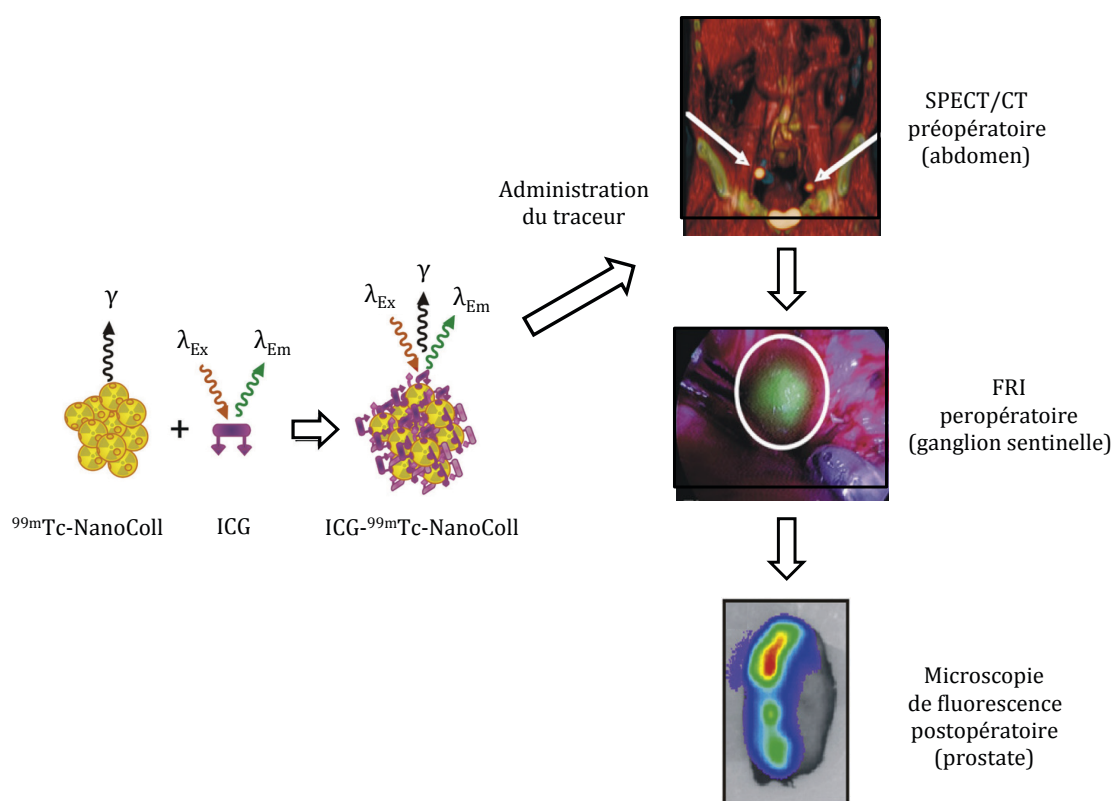


Figure 36 : *protocole expérimental des travaux de van Leeuwen.*²⁷ Les flèches et le cercle blancs indiquent les ganglions sentinelles. Reproduit avec la permission de European Urology.

Dans ce cas de figure, les avantages des deux modalités d'imagerie sont utilisés :

- La **pénétrabilité** sans limite à l'échelle du corps humain de l'imagerie nucléaire permet de détecter les zones d'accumulation du traceur partout dans le corps du patient.
- L'excellente **résolution spatiale et temporelle** de l'imagerie par fluorescence permet d'assister l'ablation des ganglions lymphatiques contaminés en temps réel. Des images très précises des tissus excisés peuvent être obtenues par microscopie de fluorescence pendant et après l'opération.

Les nanoparticules colloïdales sont particulièrement adaptées à la localisation des ganglions lymphatiques, ce qui permet de limiter la propagation métastatique des tumeurs. En revanche, elles ne permettent pas de diagnostiquer la présence de foyers tumoraux puisqu'elles ne sont pas spécifiques des cellules tumorales.¹²³ L'enjeu actuel consiste à développer des traceurs bimodaux optique / nucléaire spécifiques des tumeurs.

Des approches basées sur l'injection simultanée de deux traceurs indépendants (un traceur fluorescent et un radiotraceur) ont été développées, mais elles induisent une différence de biodistribution des deux traceurs, et un cumul de leur toxicité. L'enjeu est de réunir, sur un même agent d'imagerie, les différentes fonctionnalités d'imagerie optique et nucléaire, et de vectorisation.¹²⁴ La plupart des travaux portent sur le marquage de biomolécules via une approche dite "classique", c'est à dire que la sonde fluorescente et le radioélément sont greffés en deux temps, nécessitant deux réactions de bioconjugaison successives. Cette stratégie est souvent utilisée pour le marquage de colloïdes, de nanoparticules ou de vecteurs à haut poids moléculaire tel que des anticorps.¹²⁵ L'approche que nous envisageons d'utiliser repose sur une plate-forme multimodale composée du fluorophore et du radioélément, qui est greffée sur le vecteur via un point d'ancrage unique (MSAP pour Multifunctionnal Single-Attachment Point, ou MOMIA pour MOnomolecular Multimodal Imaging Agent)).³³ Cette stratégie offre plus de contrôle sur le ratio entre radioélément et fluorophore greffé sur le vecteur. A ce titre, notons que la sensibilité de l'imagerie nucléaire est du même ordre que celle de l'imagerie optique (cf Tableau 1), ce qui permet une association 1 : 1 du fluorophore et du radioisotope.

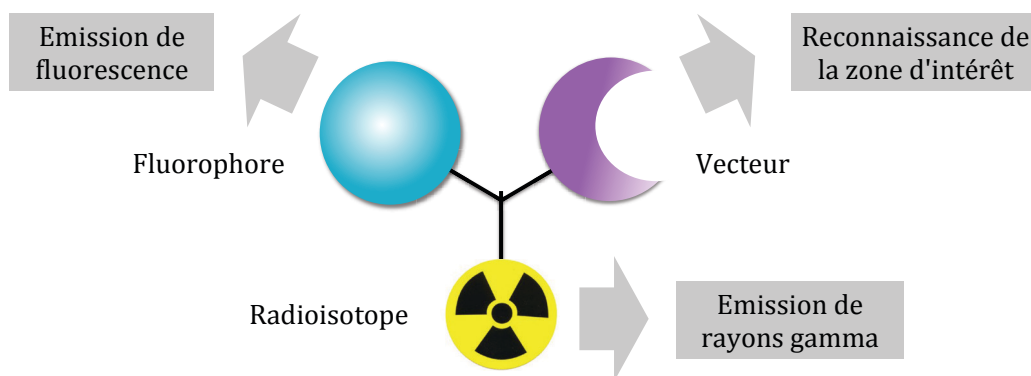


Figure 37 : schéma de l'agent de contraste ciblé : trois fonctionnalités sur une seule molécule.

3.2.2 Les agents bimodaux optique/TEP ou TEMP

Cette partie est consacrée à une revue de la littérature non exhaustive de différents agents bimodaux optique / nucléaire spécifiques des tumeurs de type MSAP. Par souci de clarté, nous ne mentionnerons pas d'agents bimodaux basés sur la fonctionnalisation des nanomatériaux.^{37,126} Les fluorophores sont représentés en bleu, les radioisotopes en rouge, l'unité de reconnaissance en vert.

Le groupe de Samuel Achilefu est spécialisé dans l'élaboration de sondes fluorescentes pour l'oncologie.¹²⁷ Récemment, il a élaboré un système bimodal optique/nucléaire performant, le LS308 présenté dans la Figure 38. Il est composé d'une cyanine 7.5, d'un agent chélatant de type DOTA et d'un peptide de type RGD.¹²⁸ Radiomarquée à l'¹¹¹In, cette molécule a démontré de bonnes propriétés d'affinité et de spécificité vis-à-vis des récepteurs $\alpha_v\beta_3$, et une forte accumulation dans les tumeurs chez la souris. Des images en FMT et en TEMP ont simultanément été obtenues chez la souris.

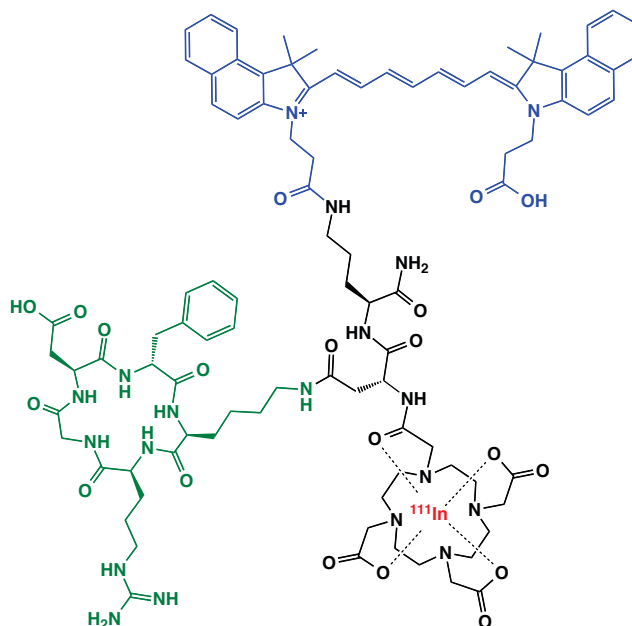


Figure 38 : structure du LS308 élaboré par Edwards et al.¹²⁸

Le groupe de Martin G. Pomper, plutôt spécialisé en radio-oncologie, a mis au point en 2011 un marqueur portant un DOTA métallé à l' ^{111}In , une cyanine de type IRDye® 800CW et un vecteur de type lysine-urée-glutamate reconnaissant l'Antigène membranaire prostatique spécifique (PSMA).¹²⁹ Ici, il est intéressant de noter la longueur importante de l'espaceur reliant le vecteur au reste de la molécule (Figure 39). Ce type de composé possède en effet de meilleures propriétés de reconnaissance du récepteur lorsque la distance entre le vecteur et l'agent chélatant ou le fluorophore dépasse 20 Å.

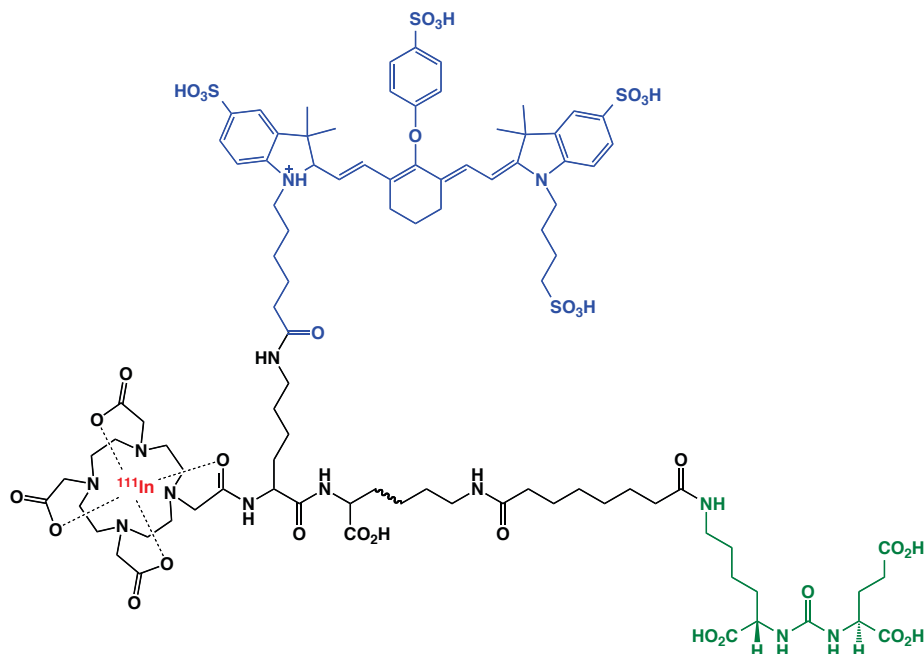


Figure 39 : agent bimodal couplant une cyanine, un complexe DOTA- ^{111}In et un vecteur ciblant les récepteurs PSMA.¹²⁹

Le groupe de Tsien a mis au point une sonde bimodale constituée d'une cyanine et d'un groupement [^{18}F]fluoroborate. La biomolécule vectrice (Lymphoseek) est un polymère ramifié de dextrose de masse moléculaire très élevée appartenant au groupe des colloïdes, et utilisé pour l'imagerie des ganglions lymphatiques. Dans ce type de marquage, la quantité d'agent imageant greffé est difficile à contrôler.

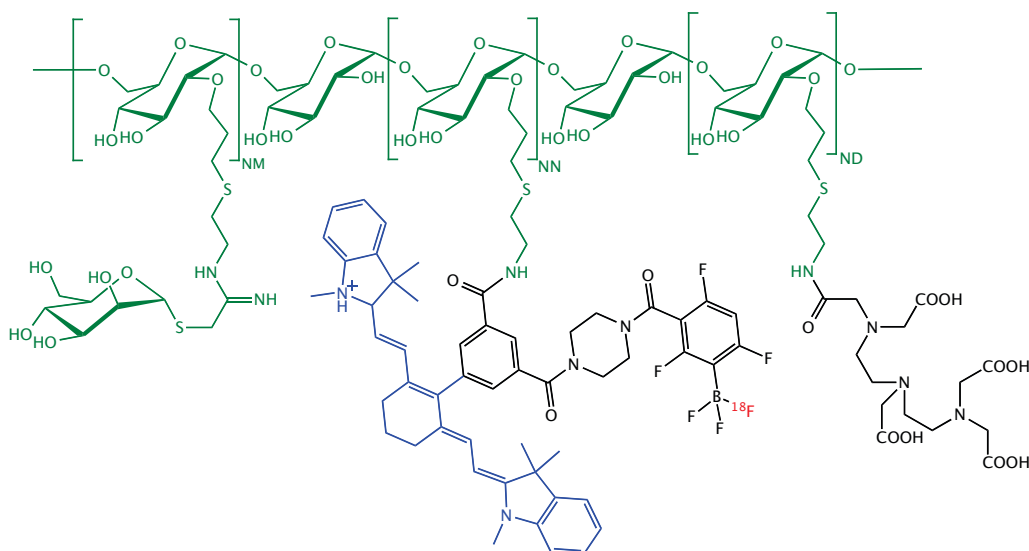


Figure 40 : système Cy 7.5- ^{18}F -Lymphoseek développé par Ting et al.¹³⁰

Les cyanines sont de loin les fluorophores les plus représentés dans la liste des agents bimodaux optique/nucléaire. D'autres fluorophores organiques ont cependant été utilisés, notamment des dérivés de la rhodamine.¹³¹ Notre équipe à Dijon travaille plus particulièrement sur l'élaboration de sondes bimodales comportant un BODIPY. Le premier BODIPY-DOTA a notamment été élaboré au cours des travaux de thèse du docteur C. Bernhard.¹³² Plus récemment, un système similaire a été couplé sur un dérivé de l'octréotide, et métallé à l'Indium.

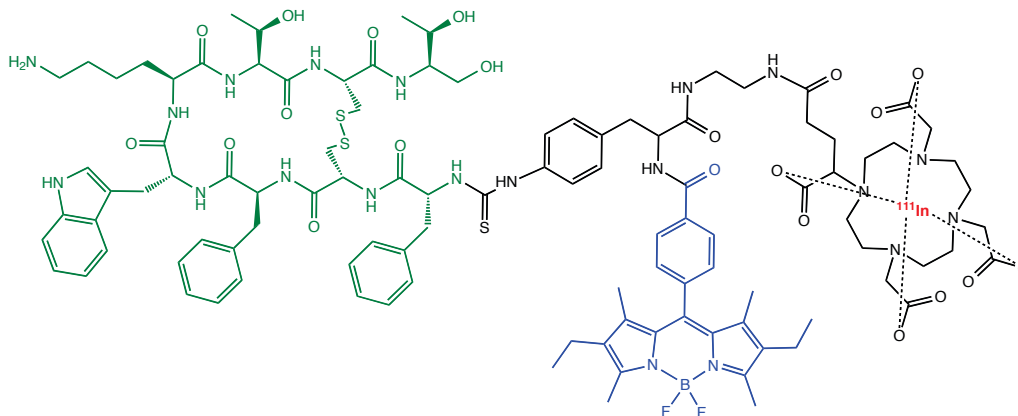


Figure 41 : structure du BODIPY-DOTAGA-In-Oc.¹³³

Plusieurs pistes sont actuellement exploitées par notre équipe pour optimiser ces systèmes, parmi lesquels l'utilisation de BODIPY styryle absorbant et émettant dans le proche infrarouge, l'hydrosolubilisation des BODIPY et la réduction de l'encombrement stérique généré par la sonde imageante (fluorophore + radioélément).

Objectifs. Ce travail de thèse basé sur la modification et les études photophysiques de dérivés de BODIPY se divise en deux chapitres distincts.

Le **chapitre II** est consacré à la modification de la structure des BODIPY en vue d'une application *in vivo* pour l'imagerie bimodale optique/TEP ou TEMP. Ces modifications concernent l'hydrosolubilisation des fluorophores, ainsi que la modulation de leurs propriétés optiques, suivant le cahier des charges présenté dans la partie 2.1. Des solutions permettant l'introduction d'éléments radioactifs sur le BODIPY, ainsi que des tests de bioconjugaison de ces composés seront également présentés.

Le **chapitre III** est consacré à l'étude photophysique de différents systèmes multichromophoriques à base de BODIPY. Ces systèmes ont été élaborés en mettant à profit les méthodes de synthèse rapportées dans le chapitre 1. Après avoir introduit les notions théoriques sur le transfert d'énergie, la caractérisation de l'effet d'antenne dans des systèmes BODIPY-porphyrine et BODIPY-corrole sera présentée.

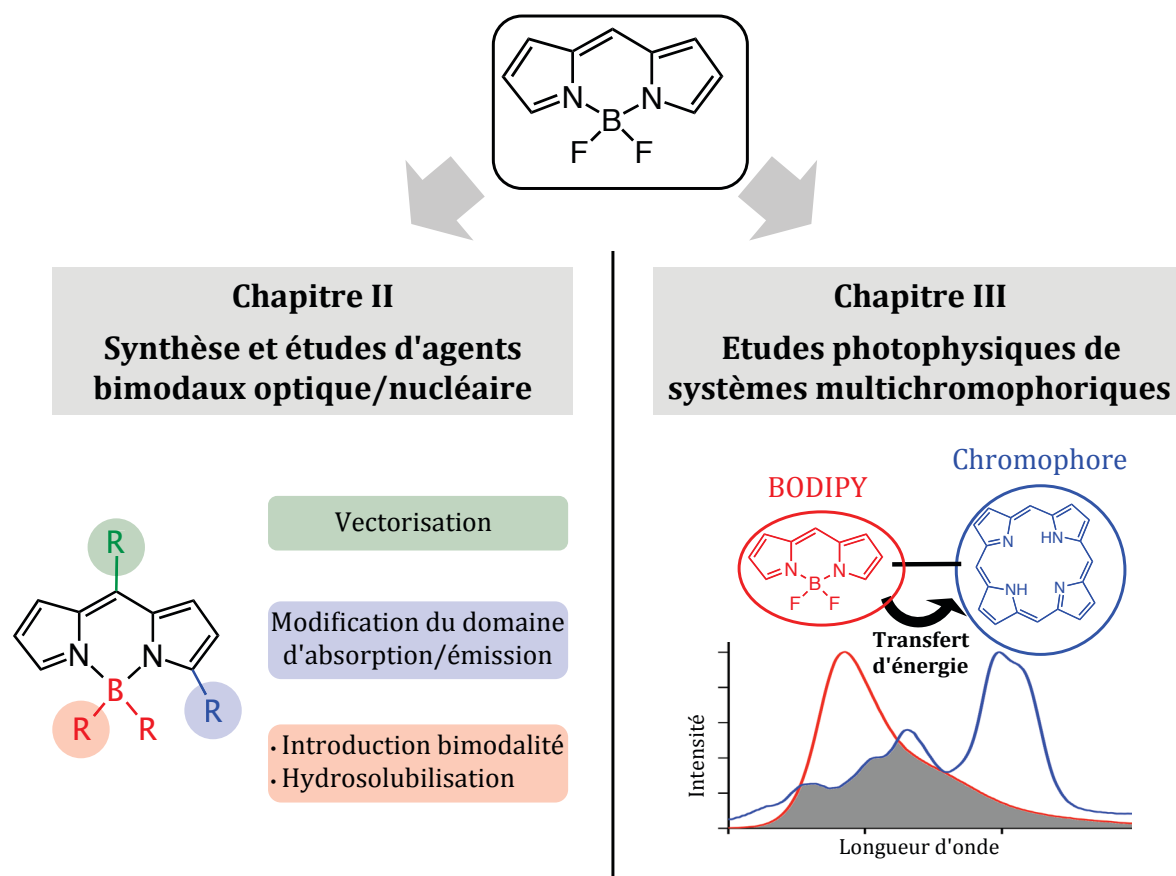


Figure 42: objectifs du travail de thèse.

CHAPITRE II

ÉLABORATION DE NOUVEAUX PRÉCURSEURS POUR L'IMAGERIE BIMODALE OPTIQUE/TEP

1 Fonctionnalisation de l'atome de bore de BODIPY par divers groupements alcoxy ou aryloxy

Dans ces travaux, nous utilisons la réactivité de la liaison bore-fluor des BODIPY pour la fonctionnalisation de l'atome de bore par des dérivés alcoxy ou aryloxy. L'introduction de dérivés macrocycliques et de groupements hydrosolubilisants est notamment envisagée. Nous cherchons également à décliner la méthode de fonctionnalisation à des BODIPY-styryles, dont le domaine d'absorption et d'émission est décalé vers le proche infra-rouge.

Nous introduirons tout d'abord les outils synthétiques permettant d'accéder à des BODIPY fonctionnalisés au niveau de l'atome de bore, avant de préciser les objectifs des travaux et de présenter l'article I. Certaines données non publiées seront ensuite présentées. La réaction consistant à substituer un BODIPY par formation d'une liaison B-O sera nommée "*O*-fonctionnalisation" dans la suite de ce manuscrit.

1.1 Introduction à l'article I.

1.1.1 Fonctionnalisation de l'atome de bore des BODIPY.

■ **Liaisons bore-carbone.** Les premiers exemples de fonctionnalisation de BODIPY au niveau de l'atome de bore impliquent la formation de liaisons B-C.¹³⁴ En 2005, le groupe de Ziessel utilise des organolithiens pour introduire des groupements éthylnyles fonctionnalisés sur l'atome de bore par substitution des atomes de fluor (Schéma 2).¹³⁵ Ces composés sont nommés *E*-BODIPY (E pour Ethynyle).

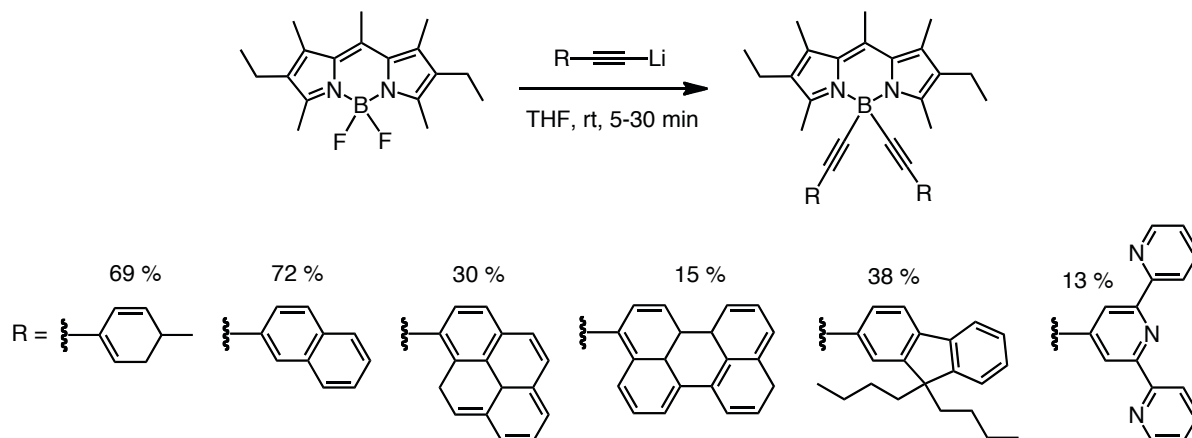


Schéma 2

Par la suite, des *E*-BODIPY portant des groupements hydrosolubilisants et anti-agrégants de type sulfonate ou PEG, comme ceux présentés dans le chapitre I.2.2.5.2, ont été élaborés.^{95,96} Ajoutons que des carbocycles¹³⁶ et des groupements alkyles¹³⁷ ont également été introduit directement sur l'atome de bore, sans espaceur éthyne. Les BODIPY portant des liaisons B-C sont très stables chimiquement.¹³⁸ De plus, ils possèdent des rendements quantiques de fluorescence élevés. Néanmoins, la formation de *C*-BODIPY ne tolère pas de fonctions électrophiles tels que des carbonyles puisqu'elle nécessite l'utilisation d'organolithiens, ou d'organomagnésiens. Ce type de fonction doit alors être introduit dans une étape postérieure.

■ **Liaisons bore-oxygène.** Le premier *O*-BODIPY (BODIPY à liaison B-O) a été décrit en 1999 par le groupe de Kevin Burgess (Schéma 3).¹³⁹ Il a été obtenu de manière intramoléculaire, par déméthylation de groupes méthoxy portés par des cycles benzéniques en position α -pyrroliques en présence de tribromure de phosphore. Le BODIPY rigidifié obtenu avec un rendement quantitatif possède la particularité d'être chiral et présente des propriétés photophysiques intéressantes : la rigidification du squelette BODIPY permet tout d'abord un déplacement bathochrome des bandes d'absorption de plus de 50 nm, par extension du système π -conjugué. En effet, la rotation des substituants aryles est entravée, ils participent d'autant plus à la délocalisation électronique. Les phénomènes de désexcitation non-radiatifs étant défavorisés par la même occasion, les rendements quantiques de fluorescence augmentent de 7 à 41 %.

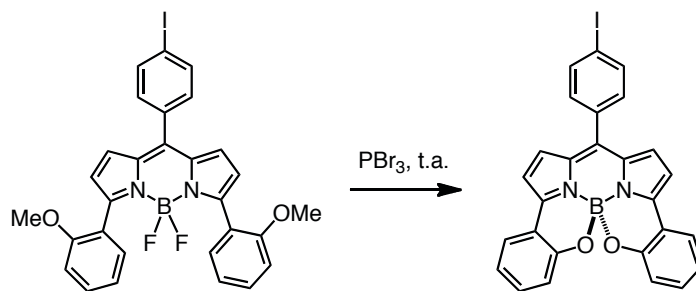
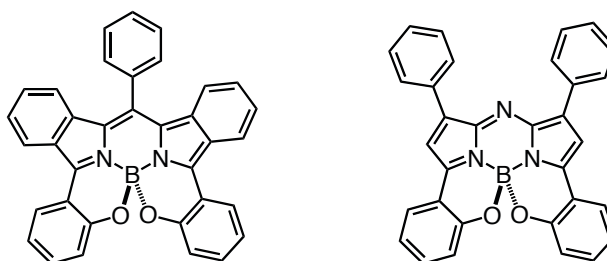
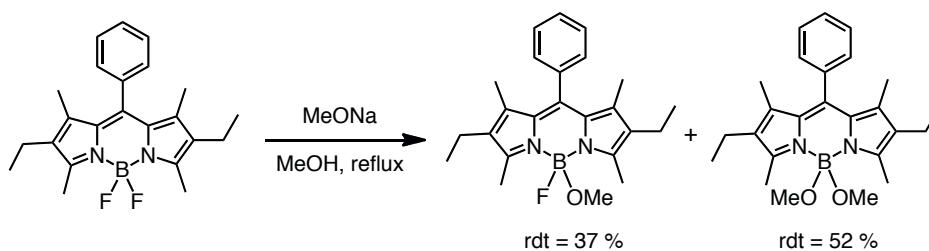


Schéma 3

Cette méthode de *O*-fonctionnalisation a ensuite été dérivée à des azaBODIPY en 2008 par le groupe de O'shea et à des benzo-BODIPY en 2011 par le groupe de Uno.^{140,141}

Figure 43 : *O*-BODIPY décrits par les groupes de O'Shea et Uno.^{140,141}

Une seconde voie d'accès à des *O*-BODIPY est décrite en 2006 par le groupe de Nagano.¹⁴² Les composés sont obtenus par substitution des atomes de fluor par des alcoolates. Un produit de monosubstitution est également isolé (Figure 44). Cette approche a été plus récemment utilisée pour la *O*-fonctionnalisation de nanoparticules par des aza-BODIPY.¹⁴³

Figure 44: *O*-BODIPY élaborés par le groupe de Nagano.¹⁴²

En 2007, le groupe de M. Hibert décrit une voie de synthèse de *O*-BODIPY impliquant une activation de la liaison B-F par un acide de Lewis (AlCl_3 ou GaCl_3) suivie de l'ajout de l'alcool dans le milieu réactionnel.¹⁴⁴ Bien que les rendements de réaction dépendent fortement de l'alcool employé (de 20 à 70 %), cette méthode constitue une voie simple de post-fonctionnalisation des BODIPY tolérante vis-à-vis de fonctions

électrophiles telles que des carbonyles, à la différence de la C-fonctionnalisation (Figure 45). De plus, les propriétés photophysiques (rendements quantiques et temps de vie de fluorescence) sont globalement peu affectées par cette modification structurale. Rappelons que l'encombrement au niveau de l'atome de bore permet de limiter les phénomènes d'empilement et d'agrégation des BODIPY.⁹⁶

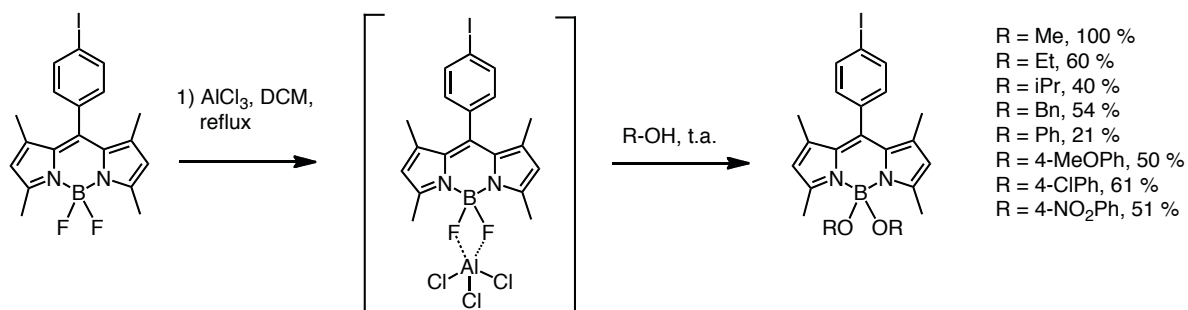


Figure 45 : divers *O*-BODIPY décrits par le groupe de Hibert.¹⁴⁴

Notons enfin que cette approche a été utilisée en 2011 par le groupe de D'Souza pour l'introduction d'un dérivé du fullerène.¹⁴⁵ Ces travaux seront abordés plus en détail dans le chapitre III.2.1.

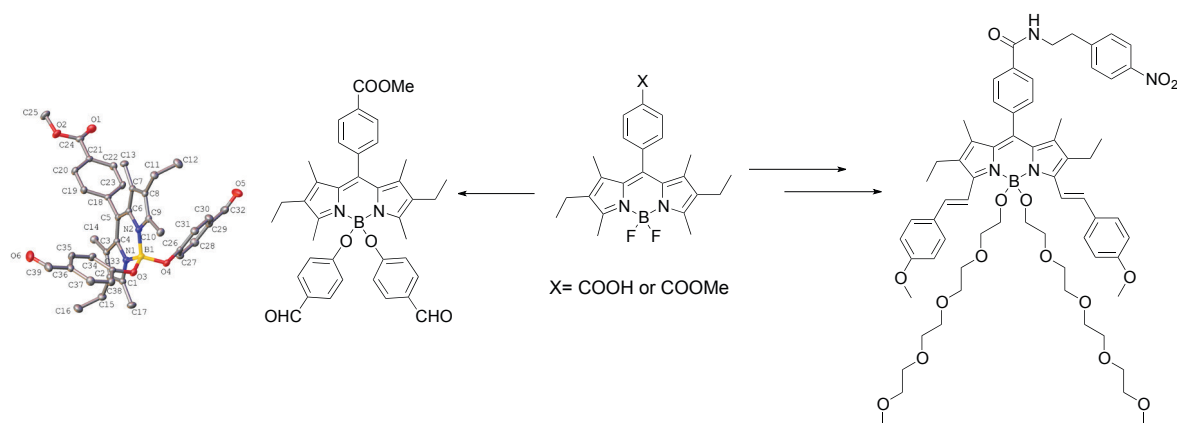
1.1.2 Objectifs

Les travaux sur la fonctionnalisation de l'atome de bore des BODIPY par des alcools ont été initiés dans notre laboratoire lors de la thèse du Dr. Claire Bernhard.¹⁴⁶ Ils se sont poursuivis lors de cette thèse, afin d'explorer plus en détail les possibilités synthétiques qu'apporte cette méthode.

Notre équipe a tout d'abord cherché à introduire un tétraazamacrocyclo par *O*-fonctionnalisation. Pour cela, des *O*-BODIPY portant des dérivés carbonylés ont été ciblés. De plus, nous avons travaillé sur l'introduction de groupements hydrosolubilisants de type polyéthylène glycol sur l'atome de bore.

1.2 Article I

Résumé de l'article I



Dans cet article, nous présentons la synthèse de nouveaux BODIPY fonctionnalisés au niveau de l'atome de bore par différents groupements alcoxy ou aryloxy. Ces composés sont synthétisés à partir de différents précurseurs BODIPY BF_2 avec divers alcools et phénols, en présence de trichlorure d'aluminium. Cette méthode a notamment permis la synthèse de fluorophores hydrosolubles par introduction de groupements polyéthylène glycol (PEG). Une étude photophysique des différents composés a permis de montrer que les *O*-BODIPY possèdent une forte fluorescence. La synthèse de BODIPY distyryle fluorescents aux longueurs d'onde du proche-infrarouge, et porteurs d'un ou deux groupements PEG, a également été réalisée. Ces systèmes semblent prometteurs pour de futures applications en imagerie médicale.

Boron Functionalization of BODIPY by various Alcohols and Phenols

Bertrand Brizet,^{a,b} Claire Bernhard,^a Yulia Volkova,^a Yoann Rousselin,^a Pierre D. Harvey,^b Christine Goze,^{*a} Franck Denat^{*a}

[a] *Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, Université de Bourgogne, France.*

[b] *Département de Chimie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.*

Published in *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2013**, *11*, 7729-7737.

Abstract. The synthesis of new B-O BODIPY derivatives functionalized with different alkoxy or diarylalkoxy derivatives is described. These compounds were synthesized from the reaction of different B-F BODIPY precursors with various alcohols and phenols, in the presence of AlCl₃. Water-soluble dyes could be synthesized as well with this method, specifically by the introduction of polyethyleneglycol (PEG) groups. A photophysical study of the different compounds were performed, and showed that the B-O BODIPY derivatives exhibit rich fluorescence properties. Finally, the conjugation of the BODIPY core has been extended using two distyryl groups hence providing blue BODIPY derivatives, in which one or two PEG groups have been anchored, making these systems very promising for future medical imaging applications.

Introduction

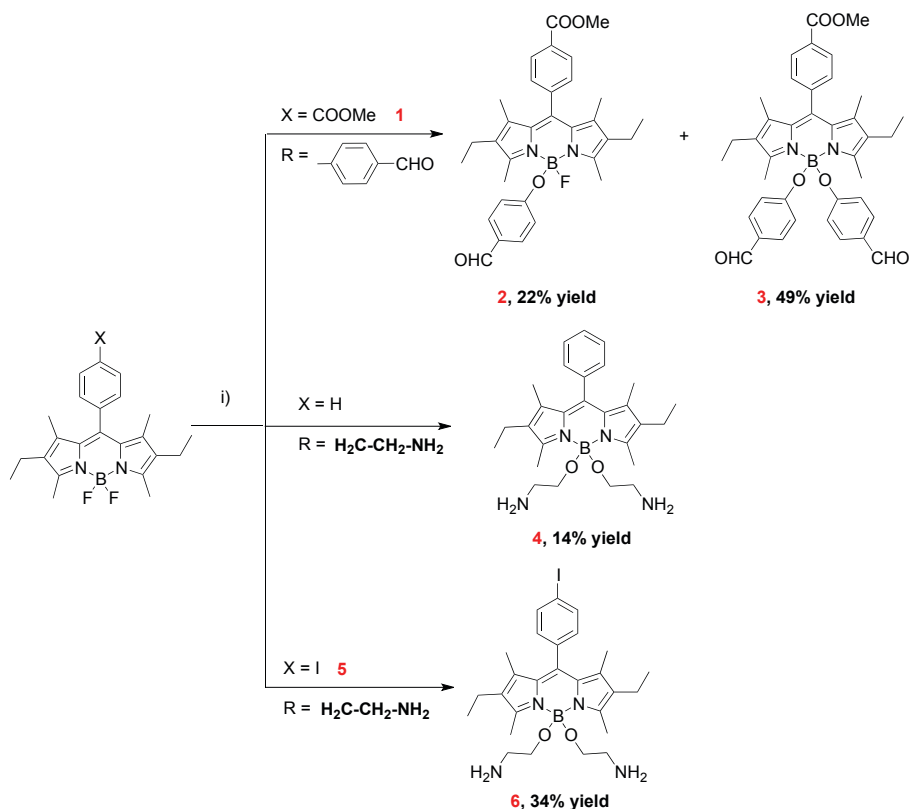
The 4,4-difluoro-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene (BODIPY) dyes have been extensively investigated because of their rich photophysical, chemical and electronic properties.¹ Indeed, this class of fluorophores exhibits numerous applications such as cation and proton sensing,² electronic switches,³ photodynamic therapy,⁴ organic solar cells,⁵ molecular imaging probes⁶ and theranostics.⁷ Among the different options for functionalization of BODIPY, the *meso*⁸, the 2,6-pyrrolic⁹, and the 3,5-pyrrolic positions¹⁰ have been extensively studied. Less frequently, the functionalization of the boron center has also been investigated, especially with alkyne groups, using nucleophilic substitution processes of the fluoride atoms with Grignard or lithiated reagents on the boron center.¹¹ However, these nucleophilic agents may not always be compatible with all functionalities, such as carboxylic acids and aldehydes.

A straightforward method for B-O functionalization was recently reported and proceeds by the treatment of BODIPY with alcohols in the presence of the Lewis acid AlCl_3 , leading to stable B-O BODIPY derivatives.¹² Using this method, alcohol- and phenol-*O*-BODIPY derivative systems were prepared and characterized,¹³ in particular bichromophoric bisporphyrin-BODIPY systems or multimodular donor-acceptor conjugates.¹⁴ Very recently, a new method for the synthesis of Cl-BODIPY from F-BODIPY was reported. These Cl-BODIPY, which are quite air-sensitive, were exploited as synthetic intermediates generated in situ for the overall conversion of F-BODIPY to O-BODIPY, using NaOMe or the dienolate-dilithium salt, in high overall yields.¹⁵

We now report the synthesis and characterization of new B-O functionalized BODIPY dyes. Different functional groups were conveniently introduced onto the boron atom, especially water solubilizing groups. The photophysical properties of some of these new systems are also reported.

Results and discussion

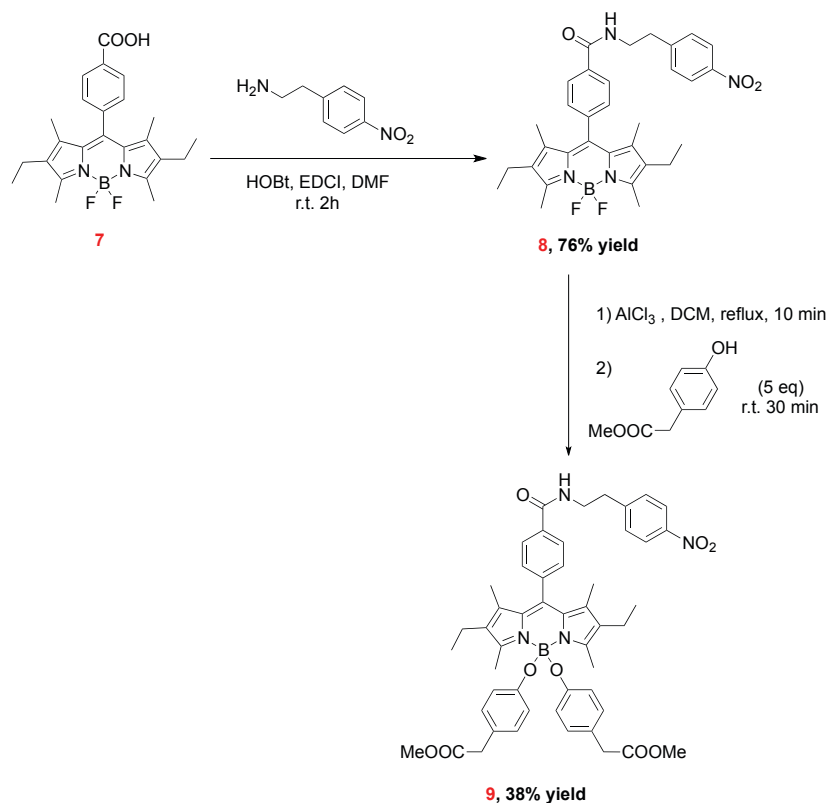
Different functional groups have been introduced on *meso*-functionalized BODIPY precursors using the method previously described.¹² This method consists of reacting two equivalents of AlCl_3 with the starting BODIPY, followed by the introduction of the alcohol or the phenol residue (Scheme 1). Hence, the boron atom can be functionalized with aldehydes functions (**3**), or amines (**4** and **6**) in 49, 14, and 34 % yield, respectively.



Scheme 1 Synthesis of different B-O BODIPY derivatives. i) AlCl_3 , DCM, reflux, 10 min; ROH, r.t., 30 min.

Interestingly, the monosubstituted B-O derivatives could also be isolated and characterized during the synthesis of compound **3**. This monosubstituted compound **2** should offer the possibility for a second functionalization to yield unsymmetrical BODIPY systems.

The *meso*-substitution of the BODIPY derivatives proved to be a powerful method, allowing an easy introduction of additional functionalities such as water solubilizing groups and activated functions for labeling biomolecules. A convenient precursor is BODIPY **7**, bearing a carboxylic group, which allows introducing the desired residue by peptidic coupling reactions. Compound **8** was obtained in 76 % yield, by coupling the 4-nitrophenylamine with **7**. Ester groups can be further introduced on the boron atom using five equivalents of 4-hydroxyphenylacetate, leading to **9** in 38 % yield (Scheme 2).

Scheme 2 Synthesis of compound **7**.

The different B-O-containing dyes were characterized by spectroscopic analysis such as NMR spectroscopy, elemental analysis, and UV-visible spectroscopy. Noteworthy, the ^{11}B NMR exhibits a expected singlet near 0.8 ppm.¹² The ^{11}B NMR spectra of compounds **1**, **2** and **3** are shown in Fig. 1 as examples, stressing on the evolution of the ^{11}B signal from the BODIPY precursor **1** (triplet, $^3J_{\text{B-F}} = 33.3$ MHz), to the mono substituted compound **2** (doublet, $^3J_{\text{B-F}} = 25.8$ MHz) and the disubstituted system **3** (singlet).

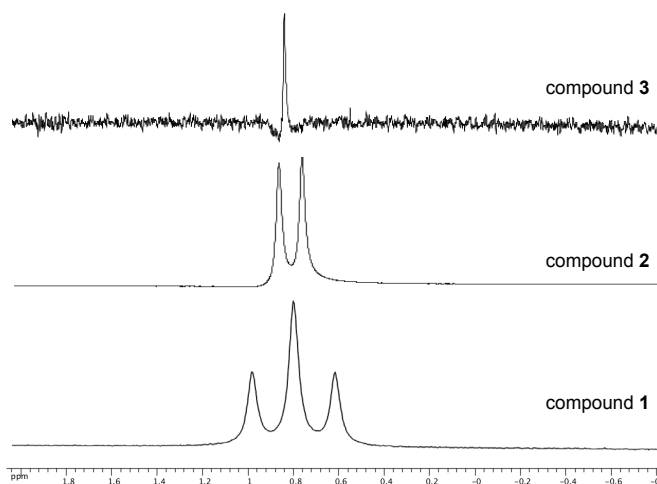


Fig. 1 ^{11}B NMR spectra comparison of compounds **1**, **2** and **3** in CDCl_3 .

Suitable crystals for X-ray diffraction analysis were obtained for compound **3**¹⁶ from a mixture of dichloromethane-hexane. The X-ray structure is shown in Figure 2.

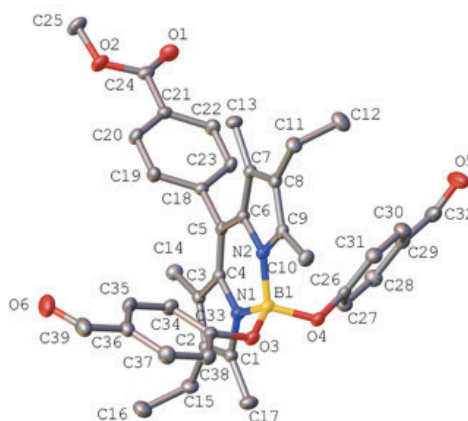
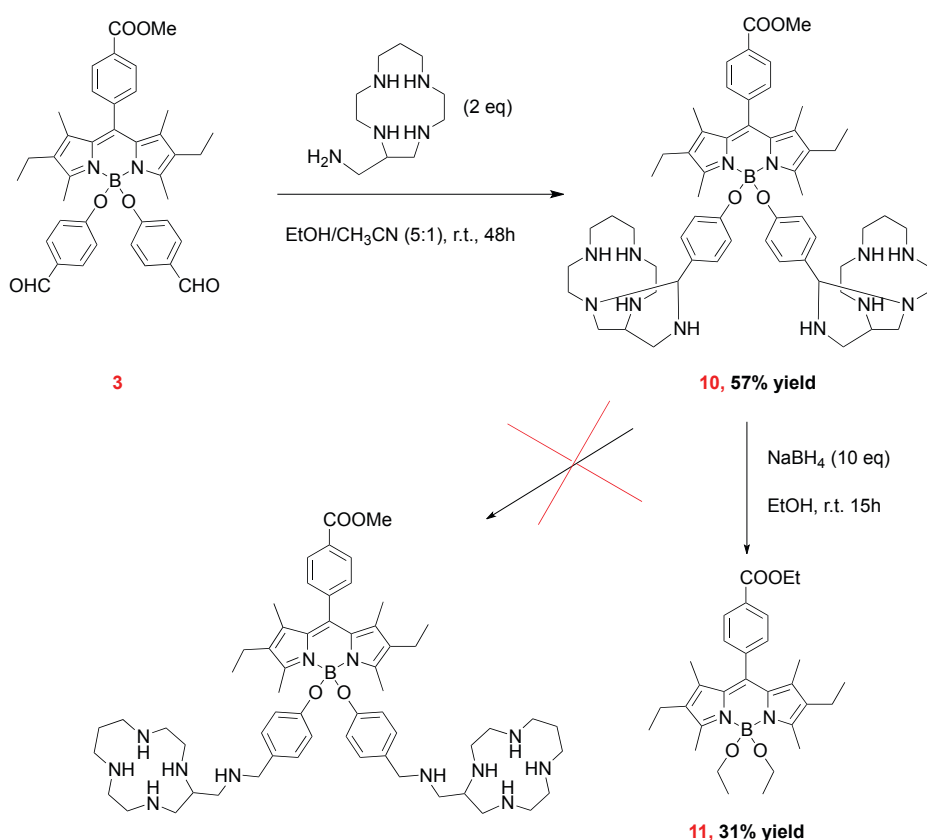


Fig. 2 OLEX2 view of **3**.¹⁷ Thermal ellipsoids are drawn at 50% probability level. The H-atoms are omitted for clarity. Selected bond length (Å) and angle (°): N1-B1 = 1.555(2), N2-B1 = 1.551(2), O3-B1 = 1.448(2), O4-B1 = 1.465(2), N2-B1-N1 = 106.39(13), O3-B1-N1 = 112.95(14), O3-B1-N2 = 112.34(14), O3-B1-O4 = 104.07(13), O4-B1-N1 = 110.57(13), O4-B1-N2 = 110.60(13).

The boron atom is in a typical T_d geometry. The selected bond distances and angles show that the tetrahedron geometry around the boron atom remains similar after *O*-functionalization.¹² The boron-dipyrromethene is perpendicular to phenyl group composed by carbon atoms, from C18 to C23, with a dihedral angle of $88.819(41)^\circ$. The

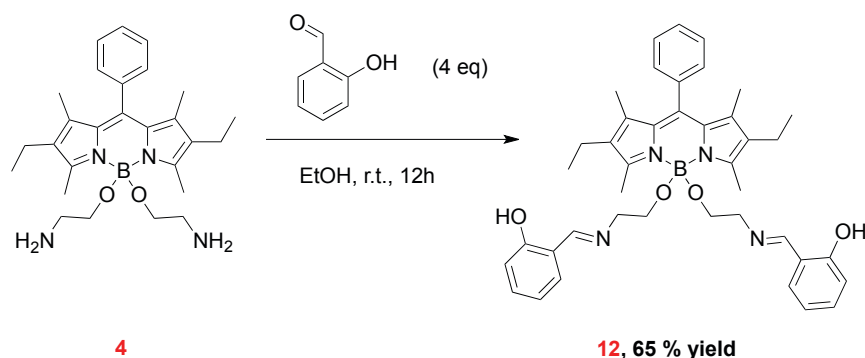
orientation of the bulkier aromatic moiety in **3** supports the fact that aggregation phenomena are not favoured in the B-O BODIPY derivatives, in comparison with B-F or B-C BODIPY compounds.¹⁵ The dihedral angles between the dipyrromethene complex and the aromatic moiety are $59.359(47)^\circ$ and $79.888(40)^\circ$, for C26 to C31 and C33 to C38 respectively. This conformation is also imposed by the crystal packing, where BODIPY skeletons arrange themselves in parallel layer (see ESI).

As the boron substitution reactions allowed us to introduce different functionalities on the boron centre, we were interested in coupling these functions with polyazamacrocyclic derivatives, which are well known to form stable complexes with various cations, in particular radiometals.¹⁸ Compound **3** was reacted with two equivalents of the aminomethyl-13ane4 macrocycle (Scheme 3).



Scheme 3 Reactivity of some B-O derivatives.

The expected imine compound was not isolated and the bisaminal system **10** was isolated instead, which has also previously been observed.¹⁹ Different attempts to reduce the two aminal functions using NaBH_4 in ethanol failed, despite it was previously shown to be the best conditions for such a reaction.¹⁹ Only the product **11** could be purified and isolated in 31% yield, resulting from the substitution of the two phenolic groups by two ethanolate. Concurrently, compound **4** reacts with the 2-hydroxybenzaldehyde to form the bis imine **12** in 65 % yield, but as mentioned above, the imine groups could not be further reduced into amine and yielded to the bis B-OEt derivative (Scheme 4).



Scheme 4 Synthesis of compound 12.

These first experiments showed that this method of boro-functionalization is highly selective, leading exclusively to the B-O derivatives. However, the B-O bonds are stable under mild reaction conditions, but are sensitive towards harsh ones. Conclusively, the B-O functionalization should be best performed during the last step of a multistep synthesis.

Table 1 summarizes the photophysical data for all investigated dyes, for which the molar absorptivities were determined in THF. All compounds exhibit two absorption bands characteristic of the BODIPY signature, which consists of the S_0-S_1 feature placed near 525 nm and the S_0-S_2 one located near 380 nm, both readily assigned to spin-allowed $\pi-\pi^*$ transitions. Again, the lowest energy absorption maxima (λ_{abs}) and molar absorption coefficients (ϵ) are collected in Table 1. They show that the functionalization on the boron atom has no influence on λ_{abs} (i.e. $523 < \lambda_{\text{abs}} < 527$ nm). However, molar absorptivity decreases with substitution of fluorine by an alcoholate group. This trend is shown in Figure 3. A high-energy band near 280 nm appears for **2** and **3**, and is attributed to the presence of hydroxybenzaldehyde groups. On the other hand, the molar absorptivity of the lowest energy band decreases significantly from **1** to **2**, and **2** to **3**.

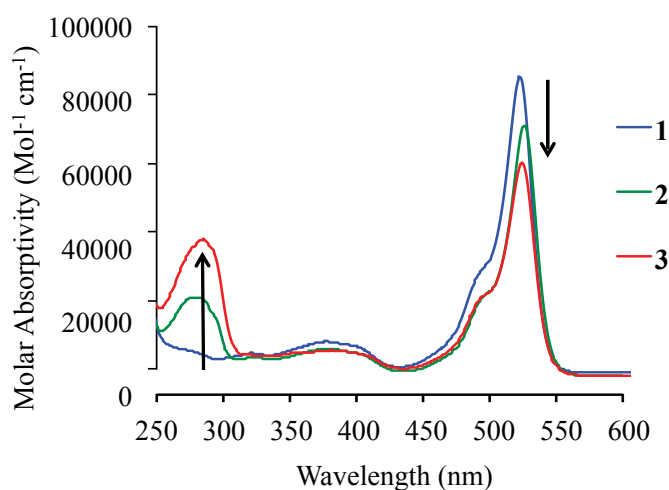


Fig. 3 Evolution of the absorption spectra from **1** (2F on the boron atom), **2** (1F and 1 OAr on the boron atom) and **3** (2 OAr on the boron atom) in THF at 298K.

These B-O functionalized dyes were studied by steady state and time-resolved emission spectroscopy in 2-MeTHF at room temperature and 77 K. The Stoke shifts are generally quite small (between 460 cm⁻¹ for **7** and 870 cm⁻¹ for **1**). The emission maxima, quantum yields, and lifetimes are given in Table 1. All compounds show an intense fluorescence with maxima located between 538 and 550 nm. Interestingly, a hypsochromic shift of the emission is observed going from **1** to **2** and from **2** to **3**, along with a decrease of Stoke shift from 870 to 490 cm⁻¹. The singlet excited state fluorescence lifetime τ_F for all dyes decays with a mono-exponential kinetic with $1.73 < \tau_F < 5.69$ ns at 298 K. The quantum yields Φ_F are high, and are not strongly influenced by the nature of the boron substituents. Nevertheless, a substantial decrease between compound **8** and **9** in both Φ_F (from 0.59 to 0.14) and τ_F (from 3.92 to 1.73 ns) is observed. As expected, τ_F for compounds **2**, **4**, **6**, **9**, **11**, **12** and **13** are similar to each other at 77 K ($7.09 < \tau_F < 9.34$ ns). Non-radiative processes competing with the fluorescence at 298 K are significantly reduced in glass matrices.

Table 1 Absorption and fluorescence spectroscopy data for BODIPY derivatives^a

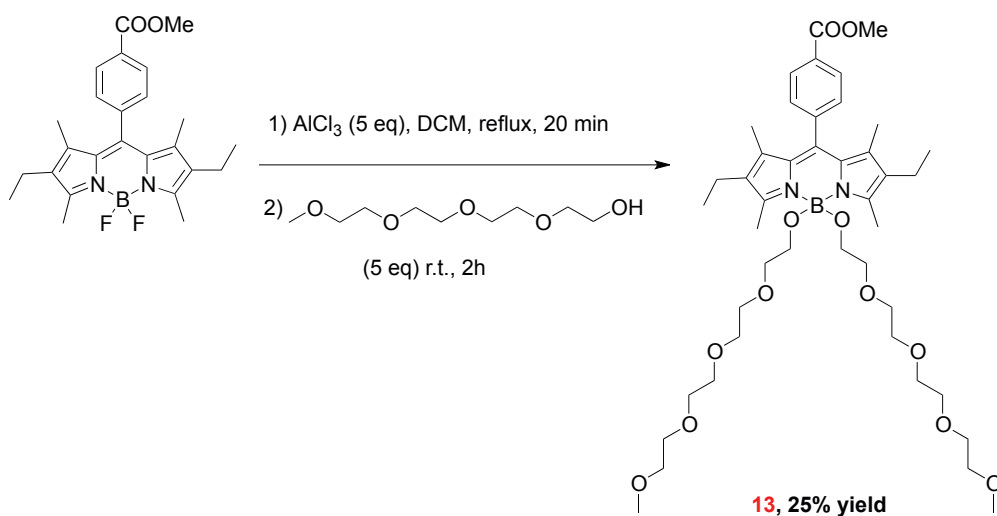
dye	$\lambda_{abs}(max)/nm$ ($\epsilon/10^{-3} M^{-1} cm^{-1}$)	$\lambda_{em}(max)/nm$	$\lambda_{ex}(max)/nm$	$\Delta\nu/cm^{-1}$	Φ_F	$\tau_F(298K)/ns$	$\tau_F(77K)/ns$	$k_r/10^8 s^{-1}$	$k_{nr}/10^8 s^{-1}$
1	525 (86.1)	550	525	870	0.63	4.59	-	1.37	1.59
2	526 (72.3)	546	526	700	0.66	2.86	8.97	2.31	2.66
3	526 (61.8)	540	526	490	0.50	2.51	-	1.99	2.39
4	523 (40.4)	538	522	530	0.42	4.76	8.85	0.88	1.09
5	526 (80.9)	540	526	490	0.65	2.71	-	2.40	2.77
6	526 (47.1)	541	527	530	0.31	4.69	9.34	0.66	0.87
7	527 (69.4)	541	527	460	0.55	4.41	-	1.22	1.45
8	526 (74.5)	540	526	490	0.59	3.92	-	1.50	1.76
9	527 (37.8)	544	527	590	0.14	1.73	8.54	0.81	1.39
11	525 (66.5)	544	525	670	0.36	3.12	7.09	1.15	1.47
12	524 (62.3)	541	523	600	0.67	5.68	8.91	1.18	1.36

^aThe molar absorptivities were measured in THF. Stoke shifts, $\Delta\nu$, were calculated using equation $1/\lambda_{abs}(max) - 1/\lambda_{ex}(max)$. The fluorescence quantum yields, Φ_F , were measured in 2-MeTHF at 298 K, using Rhodamine 6G as reference ($\Phi_F = 0.94$ in MeOH).²⁴ All Φ_F are corrected for changes in refractive index.²⁵ Fluorescence lifetimes were measured at 298 K and 77 K in 2-MeTHF. k_r (radiative rate constant) and k_{nr} (non-radiative rate constant) were calculated using the following equations: $k_r = \Phi_F/\tau_F$, $k_{nr} = (1-\Phi_F)/\tau_F$.

It is concluded that all these dyes have similar photophysical properties simply because the rigidity of the skeleton and the symmetry of the electronic wavefunctions have not been drastically altered upon the B-O functionalization. This is also consistent with the similarity of the radiative, k_r , and non-radiative rate constants, k_{nr} obtained for all dyes ($0.66 \times 10^8 < k_r < 2.31 \times 10^8 s^{-1}$, and $0.87 \times 10^8 < k_{nr} < 2.66 \times 10^8 s^{-1}$). The small

variation from one another may stem from loose bolt effect of the anchored substituents. This effect is hardly quantifiable and is of minor consequence in this work.

The main drawback for the use of BODIPY dyes in medical imaging is their very poor solubility in water. Indeed, it is still currently a great challenge to introduce, in a simple manner, solubilizing groups,²⁰ especially in the last step of their synthesis.²¹ For this aim, this B-O functionalization method is adequate for adding solubilizing groups like PEG (polyethyleneglycol), which can be introduced during the last step. Moreover, PEG-containing B-O BODIPY are also interesting because it was demonstrated that they prevent molecular aggregation in water.^{13b} Therefore an excess of tetraethyleneglycol monomethyl ether was added to the BODIPY ester precursor, and yielded the water soluble compound **13** in 25 % yield (Scheme 5).



Scheme 5 Reaction scheme for the introduction of PEG groups on the boron atom.

The absorption, emission and excitation spectra of compound **13** in water are represented in Figure 4. It is interesting to note that no aggregation band corresponding to either H- or J-dimers could be detected in the UV-Visible spectra. Moreover, the system exhibits a strong fluorescence with both Φ_F and τ_F comparable to other common BODIPY-based dyes ($\Phi_F = 0.49$, $\lambda_{\text{exc}} = 523 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 544 \text{ nm}$, $\tau_F = 4.68 \text{ ns}$).^{1c}

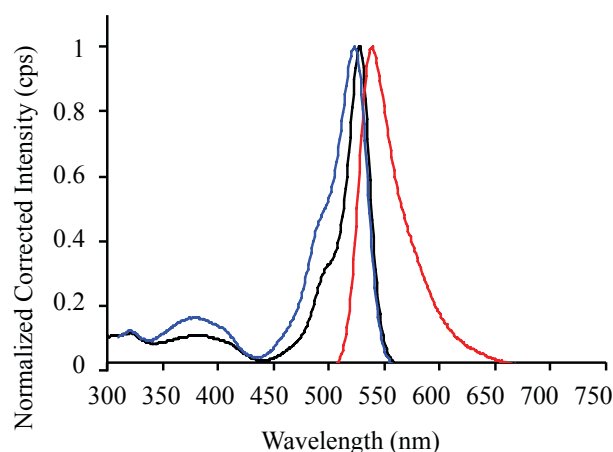
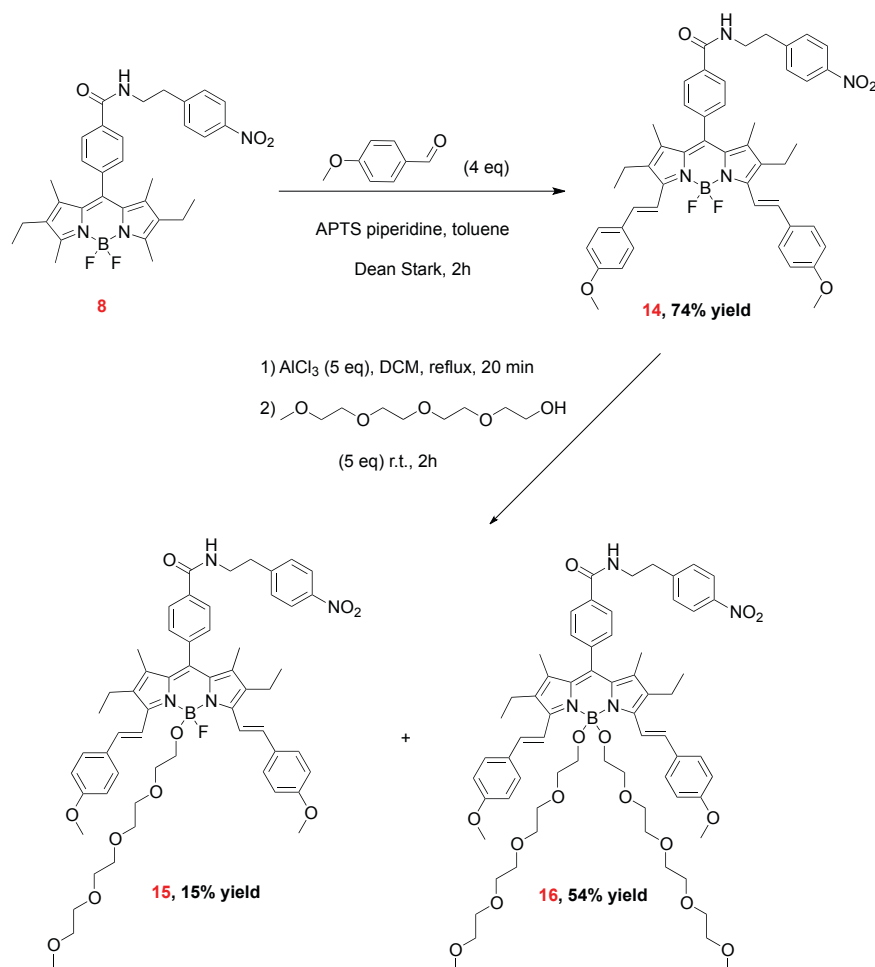


Fig. 4 Absorption (black), emission (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 610$ nm) spectra of 13 in water at 298 K.

Finally, the introduction of solubilizing groups such as PEG onto the near-infrared emitting BODIPY units such as distyryl BODIPY, is even more convenient for *in vivo* imaging applications, owing to the very low tissue autofluorescence and high tissue penetration depth in the NIR spectrum window.²² For this purpose, the distyryl BODIPY **14** was synthesized using a reported method, which consists in a Knoevenagel condensation between **8** and 4 equivalents of *p*-anisaldehyde in the presence of *p*-toluenesulfonic acid (PTSA) and piperidine, in a Dean Stark apparatus, using dry toluene as solvent (Scheme 6).²³



Scheme 6 Synthesis of PEG-containing distyryl B-O derivatives (**15** and **16**).

The reaction can be monitored by UV-Visible spectroscopy. After purification, **14** can be obtained in 74 % yield. One or two PEG groups were then added onto **14** providing **15** and **16** in 15 % and 54% yield, respectively. The synthesis of monosubstituted derivatives seems to be inherent to the synthesis of B-O derivatives, and it may explain why the yields of formation do not exceed 54 %. Interestingly, **16** is water-soluble, despite the presence of two hydrophobic styryl groups, which is quite promising for future potential applications of these systems in molecular imaging.

Conclusion

The reported synthesis of B-O BODIPY derivatives represents a promising method for selective functionalization of BODIPY. Water-soluble dyes can also be obtained, including near-infrared emitting ones. A photophysical study was conducted and confirmed that the B-O BODIPY derivatives exhibit rich fluorescence properties and are promising candidates for medical imaging.

Experimental Section

All chemicals and solvents purchased from Aldrich and Acros were used without further purification. BODIPY precursors and the macrocycle (1, 4, 7, 10-tetraazacyclotridecan-5-yl)methanamine were prepared according to literature procedures.^{6a,19,26} The NMR spectra were recorded at 300.1, 96.3 and 75.5 MHz for ¹H, ¹¹B and ¹³C, respectively at room temperature. The IR spectra were recorded on ATR spectrometer (Attenuated Total Reflectance) with Golden Gate Bruker Vector 22. The UV-visible absorption spectra were recorded on Varian Cary 50 and Varian Cary 300 Bio. The elemental analyses were performed with Fisons EA-1108 CHNS elemental analyzer instrument. The high resolution and accurate mass measurements were carried out using a Bruker microTOF-QTM ESI-TOF (Electro Spray Ionization – Time of Flight) and a Thermo Scientific* LTQ Orbitrap mass spectrometers. The steady-state fluorescence emission and excitation spectra were obtained on a Fluorolog SPEX 1680 0.22m double monochromator spectrometer. All fluorescence spectra were corrected for apparatus response. Fluorescence lifetimes were measured on an apparatus incorporating a nitrogen laser as the source and a high-resolution dye laser (fwhm = 1.4 ns). Fluorescence lifetimes were obtained from high-quality decays and deconvolution or distribution lifetime analysis. The uncertainties ranged from 20 to 40 ps on the basis of multiple measurements.

Compound 1. 2,4-Dimethylethylpyrrole (7.5 g, 60.9 mmol) and methyl 4-formylbenzoate (5.0 g, 30.5 mmol) were dissolved in dichloromethane (2 L). Trifluoroacetic acid (140 μ L) was added and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. A solution of 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone (6.9 g, 30.5 mmol) in dichloromethane was added to the mixture and the solution was further stirred for 50 min, and triethylamine (60 mL) and BF₃, Et₂O (60 mL) were added, and the reaction mixture turned purple. After stirring for 1 h, the reaction mixture was washed with water, dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (dichloromethane–hexane 40 : 60) followed by recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give pure **1** as a red solid (m = 6.0 g, yield = 45%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.90 (t, ³J = 7.6 Hz, 6H), 1.18 (s, 6H), 2.22 (q, ³J = 7.6 Hz, 4H), 2.46 (s, 6H), 3.90 (s, 3H), 7.33 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 8.10 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H).

Compounds 2 and 3. 700 mg of **1** (1.6 mmol) were added to a solution of aluminium trichloride (320 mg, 3.0 mmol) in dry dichloromethane (35 mL). The mixture was refluxed for 10 min under a nitrogen atmosphere. After cooling to room temperature, 950 mg of 4-hydroxybenzaldehyde (7.8 mmol) were added to the purple solution, and the resulting mixture was stirred at room temperature for 30 min. The reaction mixture was washed with water (3 \times 10 mL) to remove the excess of aluminum chloride. The organic fraction was dried over MgSO₄ and the solvent was removed under reduced pressure. The

crude product was purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate/hexane 1:1) followed by recrystallization in a mixture of dichloromethane/ hexane to give pure **2** (190 mg, 22 % yield) and **3** (360 mg, 49 % yield) as reddish solids. Compound **2**: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.89 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 6H), 1.26 (s, 6H), 2.21 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 2.45 (s, 6H), 3.97 (s, 3H), 6.65 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H), 7.43 (m, 2H), 7.54 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 8.26 (m, 2H), 9.76 (s, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 11.9 (*2), 12.7 (*2), 14.5 (*2), 17.1 (*2), 52.4, 118.3 (*2), 128.6 (*2), 128.7 (*2), 128.8 (*2), 130.3 (*2), 130.4 (*2), 130.5 (*2), 132.0 (*2), 133.7, 138.7, 138.7, 140.4, 154.8, 166.5, 190.9. ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 0.82 (d, $^1J = 25.8$ Hz). ESI-MS: $m/z = 563.4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. UV-Vis λ_{max} (CH_3CN)/nm: 527 ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$: 72300), 496 (23000), 380 (7400), 278 (20300), 241 (27700), 227 (24100). Anal. calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{BN}_2\text{O}_4 \cdot 0.1 \text{ H}_2\text{O}$: C (70.88 %), H (6.36 %), N (5.17 %); found: C (70.64 %), H (6.44 %), N (5.04 %). Compound **3**: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.87 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 6H), 1.33 (s, 6H), 2.21 (q, $^3J = 7.6$ Hz, 4H), 2.49 (s, 6H), 4.03 (s, 3H), 6.76 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H), 7.43 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.69 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H), 8.26 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 9.83 (s, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 12.1 (*2), 12.9 (*2), 14.4 (*2), 17.0 (*2), 52.5, 118.7 (*4), 128.6 (*2), 129.1 (*2), 130.6 (*2), 130.8, 131.1, 131.9 (*4), 134.3 (*2), 139.1, 139.2 (*2), 140.0 (*2), 155.3 (*2), 162.4 (*2), 166.4, 191.0 (*2). ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 0.84 (s). ESI-MS: $m/z = 665.28$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1307.55 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, 1949.81 $[3\text{M}+\text{Na}]^+$. UV-Vis λ_{max} (CH_3CN)/nm: 526 ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$: 61800), 496 (23300), 382 (7700).

Compound 4. 0.5 mL of ethanolamine (8.33 mmol) was added to a vigorously stirred suspension of 200 mg of aluminium trichloride (1.54 mmol) and 270 mg of 4,4-difluoro-8-phenyl-1,3,5,7-tetramethyl-2,6-diethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (0.71 mmol) in dry dichloromethane (30 mL). The mixture was refluxed for 2 h. The crude product was purified by silica gel column chromatography (dichloromethane/ Et_3N 95:5) followed by recrystallization in a mixture of dichloromethane/hexane to obtain pure **4** as a red solid (46 mg, 14 % yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.91 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.20 (s, 6H), 1.90 (br.s, 4H), 2.22 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 2.49 (s, 6H), 2.63 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 4H), 2.95 (t, $^3J = 5.3$ Hz, 4H), 7.20-7.23 (m, 2H), 7.39-7.41 (m, 3H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 11.7 (*2), 12.6 (*2), 14.7 (*2), 17.9 (*2), 43.7 (*2), 63.0 (*2), 128.4 (*2), 128.6, 128.9 (*2), 132.0 (*2), 132.6 (*2), 136.2 (*2), 136.8 (*2), 140.2, 153.6. ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 2.18 (s). UV-Vis λ_{max} ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 4:1)/nm: 522 ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$: 36900), 494 (14700), 392 (4900), 374 (5100), 323 (4400), 287 (4300), 232 (13000). IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3366 (w), 1538 (s), 1417 (s), 1303 (s), 1173 (s), 1111 (s), 969 (s). ESI-MS: $m/z = 485.3060$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI) 485.3060, calculated for $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{BN}_4\text{O}_2\text{Na}^+$ 485.3063.

Compound 6. 0.25 mL of ethanolamine (4.12 mmol) was added to a vigorously stirred suspension of 70 mg of aluminium trichloride (0.52 mmol) and 100 mg of **5** (0.20 mmol) in dry dichloromethane (10 mL). The mixture was refluxed for 2 h. The crude product was

purified by silica gel column chromatography (dichloromethane/Et₃N 9:1) and recrystallization in a mixture of dichloromethane/hexane was performed to give pure **6** as a red solid (40 mg, 34% yield). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.91 (t, ³J = 7.6 Hz, 6H), 1.25 (s, 6H), 1.39 (br.s, 4H), 2.24 (q, ³J = 7.6 Hz, 4H), 2.49 (s, 6H), 2.64 (t, ³J = 5.4 Hz, 4H), 2.92 (t, ³J = 5.4 Hz, 4H), 6.99 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.76 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H). ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 12.0 (*2), 12.7 (*2), 14.7 (*2), 17.2 (*2), 43.9 (*2), 64.2 (*2), 94.3, 130.3 (*2), 131.8, 132.8 (*2), 135.9 (*2), 136.4 (*2), 138.1 (*2), 138.5, 154.0 (*2). ¹¹B NMR (192.5 MHz, CDCl₃): δ 2.26 (s). IR (cm⁻¹): 3366 (w), 3266 (w), 1539 (s), 1467 (s), 1308 (s), 1175 (s), 1110 (s), 969 (s). UV-Vis λ_{max} (CH₃CN/H₂O. 4:1)/nm: 524 (ε/ M⁻¹cm⁻¹ 53800), 492 (20300), 396 (5900), 371 (6700), 323 (5000), 286 (5300), 240 (33900). ESI-MS: 611.2 [(M+Na)⁺], 528.2 [(M-OC₂H₆N)⁺], HRMS (ESI) 611.2016, calculated for C₂₇H₃₈BN₄O₂Na⁺ 611.2030. Anal. calcd. for C₂₇H_{42.4}BN₄O₂: calculated C (51.64%), H (6.81%), N (8.92%); found C (51.32%), H (6.33%), N (8.44%).

Compound 7. 2,4-Dimethylethylpyrrole (10.3 g, 83.9 mmol) and 4-carboxybenzaldehyde (6.3 g, 42 mmol) were dissolved in dichloromethane (2.6 mL). Trifluoroacetic acid (328 μL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 48 h. A solution of DDQ 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone (9.53 g, 42 mmol) in dichloromethane was added and the mixture was stirred for 50 min. Triethylamine (84 mL, 630 mmol) and BF₃, Et₂O (85 mL, 672 mmol) were added and the solution turned purple. After 2 h of stirring, the reaction mixture was washed with water, dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (AcOEt–hexane 90 : 10). Recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane gave **7** as a red solid (m = 8.40 g, yield = 47%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.92 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H), 1.21 (s, 6H), 2.24 (q, ³J = 7.5 Hz, 4H), 2.47 (s, 6H), 7.39 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 8.18 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H).

Compound 8. N-Hydroxybenzotriazole (640 mg, 4.7 mmol), diisopropylamine (1.15 mL, 7.1 mmol), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (900 mg, 4.7 mmol) and 4-nitrophenethylamine hydrochloride (486 mg, 2.4 mmol) were added dropwise to a solution of **7** (1 g, 2.4 mmol) in 50 mL of dimethylformamide and the solution was stirred at room temperature. After total consumption of starting material (2 h) monitored by TLC, the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (2*100 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulphate and the solvent was evaporated to give a red oil. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (ethyl acetate/hexane 60:40) followed by recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give pure **8** as a reddish solid (1.21 g, 76% yield). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.95 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H), 1.22 (s, 6H), 2.27 (q, ³J = 7.5 Hz, 4H), 2.51 (s, 6H), 3.10 (t, ³J_A = 7.1 Hz, 2H), 3.78 (td, ³J_A = 7.1 Hz, ³J_B = 6.0 Hz, 2H), 6.27 (t, ³J_B = 6.0 Hz, 1H), 7.37 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.43 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H), 7.83 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 8.19 (d, ³J = 8.7 Hz, 2H). ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 12.0 (*2), 12.3 (*2), 14.3 (*2), 17.0 (*2), 35.7,

41.0, 124.0 (*2), 127.5 (*2), 129.0 (*2), 129.7 (*2), 130.4, 133.1, 134.5, 138.0 (*2), 138.5 (*2), 139.5, 146.6 (*2), 146.9, 154.3 (*2), 166.8. ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 0.78 (t, $^1J = 33.6$ Hz), ESI-MS: $m/z = 578.28$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 595.26 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. UV-Vis λ_{max} (THF)/nm: 524 ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 78700), 496 (28100), 377 (8800). Anal. calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_3$: Calculated C (67.14 %), H (6.16 %), N (9.79 %) ; found C (66.78 %), H (6.27 %), N (9.33 %).

Compound 9. 145 mg of 4-hydroxyphenylacetate (0.87 mmol) were added to a vigorously stirred suspension of 117 mg of aluminium trichloride (0.87 mmol) and 100 mg of **8** (0.17 mmol) in dry dichloromethane (25 mL). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. The crude product was purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate/hexane 4:1) followed by recrystallization in a mixture of dichloromethane/hexane to obtain pure **9** as a reddish solid (183 mg, 38 % yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.83 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.22 (s, 6H), 2.15 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 2.47 (s, 6H), 3.11 (t, $^3J_A = 7.1$ Hz, 2H), 3.45 (s, 4H), 3.63 (s, 6H), 3.79 (td, $^3J_A = 7.1$ Hz, $^3J_B = 6.0$ Hz, 2H), 6.36 (t, $^3J_B = 6.0$ Hz, 1H), 6.52 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H), 6.95 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H), 7.30 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.43 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 7.86 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 8.19 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 12.1 (*2), 12.9 (*2), 14.6 (*2), 17.1 (*2), 35.8, 40.3 (*2), 41.0, 51.9 (*2), 115.5-118.7-124.0-124.6-127.6-129.1-129.7-129.8-130.5-130.9-133.7-134.5-137.9-139.7-146.6-155.2-155.8 (*33), 166.9, 172.8 (*2). ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 0.85 (s). ESI-MS: $m/z = 767.37$ $[\text{M}_2+\text{Na}]^+$, 783.34 $[\text{M}_2+\text{K}]^+$, 865.37 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 887.39 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 903.36 $[\text{M}+\text{K}]^+$. UV-Vis λ_{max} (THF)/nm: 527 ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$: 37800), 500 (16200), 381 (6500), 277 (23900).

Compound 10. 230 mg of **3** (1.07 mmol) were added to a solution of 13aneN4 (340 mg, 0.53 mmol) in a mixture of ethanol/acetonitrile (100 mL/20 mL). The solution was stirred at room temperature for 48 h. After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in dichloromethane (50 mL) and washed 3 times with water (50 mL). The organic layer was isolated, dried over magnesium sulphate and the solvent was evaporated to give **10** as a reddish solid (318 mg, 57 % yield). ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 0.81 (s). ESI-MS: $m/z = 519.36$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 530.35 $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^{2+}$, 1037.69 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Compound 11. 31 mg of NaBH_4 (830 μmol) were slowly added to a solution of **10** (86 mg, 83 μmol) in 20 mL of EtOH. The mixture was stirred at room temperature for 15 h. and the solvent was evaporated. The residue was dissolved in 20 mL of chloroform and the insoluble salts were eliminated by filtration on Clarcel ®. The filtrate was evaporated and the crude product was purified by column chromatography on silica gel (ethyl acetate/hexane 50:50) followed by precipitation in DCM/hexane. The desired compound was not observed, but the byproduct **11** was obtained as a reddish solid (13 mg, 31 % yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.91 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 0.97 (t, $^3J = 7.0$ Hz, 6H), 1.19 (s, 6H), 1.38 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3H), 2.23 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 2.49 (s, 6H), 2.98 (q,

$^3J = 7.0$ Hz, 4H), 4.37 (q, $^3J = 7.1$ Hz, 2H), 7.34 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 8.10 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 10.9 (*2), 11.5 (*2), 13.4, 13.8 (*2), 16.2 (*2), 16.8(*2), 55.5 (*2), 60.3, 127.9 (*2), 129.0 (*2), 129.6, 130.5 (*2), 131.5 (*2), 134.8 (*2), 137.5, 140.5, 153.6 (*2), 165.2. ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 1.94 (s). ESI-MS: $m/z = 527.31$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, UV-Vis λ_{max} (CH_3CN)/nm: 522 ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$: 55600), 496 (25200), 381 (6800).

Compound 12. To a solution of diamine **4** (50 mg, 0.11 mmol) in dry ethanol (4 mL) under argon was added salicylaldehyde (0.035 mL, 0.44 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature over molecular sieves over night. The solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by alumina gel column chromatography (dichloromethane) to obtain **12** (48 mg, 65% yield) as a reddish oil which slowly crystallized during storage. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.93 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.25 (s, 6H), 2.20 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 2.38 (s, 6H), 3.26 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 4H), 3.63 (t, $^3J = 6.0$ Hz, 4H), 6.80 (td, $^3J = 7.4$, $^4J = 1.1$ Hz, 2H), 6.86 (d, $^3J = 8.0$ Hz, 2H), 7.17 (dd, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.8$ Hz, 2H), 7.23 (td, $^3J = 7.7$, $^4J = 1.8$ Hz, 2H), 7.26-7.32 (m, 2H), 7.44-7.47 (m, 3H), 8.30 (s, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 11.1 (*2), 12.5 (*2), 14.6 (*2), 17.1 (*2), 61.3 (*2), 61.8 (*2), 116.9 (*2), 118.2 (*2), 118.9, 128.5, 128.6 (*2), 128.9 (*2), 131.1 (*2), 131.8 (*2), 131.9, 132.0 (*2), 132.7 (*2), 136.3, 136.8 (*2), 140.1, 153.9 (*2), 161.6 (*2), 165.6 (*2). ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 2.01 (s). IR (cm^{-1}): 3056 (w), 2960 (w), 1632 (s), 1538 (s), 1469 (s), 1304 (s), 1175 (s), 1113 (s), 970 (s). UV-Vis λ_{max} ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 4:1)/nm: 524 ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 61000), 492 (19600), 404 (7500), 387 (8100), 323 (8900), 281 (10100), 253 (23700), 215 (54700). ESI MS 693.4 $[(\text{M}+\text{Na})^+]$, 506.3 $[(\text{M}-\text{OC}_2\text{H}_4\text{NCHC}_6\text{H}_4\text{OHN})^+]$. HRMS (ESI) 693.3596, calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{BN}_4\text{O}_4\text{Na}^+$ 693.3583.

Compound 13. 111.00 μL of tetraethyleneglycol monomethyl ether (0.57 mmol) were added to a vigorously stirred suspension of aluminium trichloride (76 mg, 0.57 mmol) and 50 mg of **1** (0.11 mmol) in dry dichloromethane (15 mL). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. The crude product was purified by silica gel column chromatography (dichloromethane/methanol 9:1) to obtain pure **13** as a reddish oil (23 mg, 25 % yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.95 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.20 (s, 6H), 2.15 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 2.49 (s, 6H), 3.34 (s, 6H), 3.57 (m, 32H), 3.95 (s, 3H), 7.38 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 8.13 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 11.8 (*2), 12.5 (*2), 14.7 (*2), 17.1 (*2), 52.4, 59.0-60.5-61.8-70.5-71.9-72.2-72.6 (*18), 129.0 (*2), 130.1 (*2), 130.4, 131.5 (*2), 132.7 (*2), 136.3 (*2), 138.4, 141.4, 154.6 (*2), 166.7. ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 2.08 (s). ESI-MS: $m/z = 837.47$ $[(\text{M}+\text{Na})^+]$. UV-Vis λ_{max} (THF)/nm: 524 ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$: 46400), 494 (14800), 379 (5200), 318 (5700), 270 (7100), 240 (22800).

Compound 14. Compound **8** (500 mg, 0.87 mmol) and *p*-anisaldehyde (425 μ L, 3.49 mmol) were dissolved in dry toluene (50 mL). *p*-toluenesulfonic acid (PTSA, 24 mg, 0.14 mmol) and piperidine (3 mL, 30 mmol). The mixture was refluxed during 2 h in Dean-Stark apparatus and the solvent was removed *in situ*. 50 mL of dry toluene and 3 mL of piperidine (30 mmol) were added, and the mixture was refluxed 2 h once again. After total consumption of starting material followed by UV-Vis, the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3*100mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulphate and the solvent was evaporated. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give pure **14** as a blue solid (521 mg, 74 % yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.08 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.22 (s, 6H), 2.53 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.05 (t, $^3J_A = 7.1$ Hz, 2H), 3.72 (td, $^3J_A = 7.1$ Hz, $^3J_B = 5.9$ Hz, 2H), 3.78 (s, 6H), 6.26 (t, $^3J_B = 5.9$ Hz, 1H), 6.87 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 4H), 7.15 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 2H), 7.35 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.37 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 7.51 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 4H), 7.60 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 2H), 7.79 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 8.14 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 11.8 (*2), 14.1 (*2), 18.4 (*2), 35.7, 41.0, 55.4 (*2), 114.3 (*4), 118.0 (*2), 123.9 (*2), 127.6 (*2), 128.8 (*4), 129.3 (*2), 129.6 (*2), 130.2 (*2), 132.5, 134.0 (*2), 134.6 (*2), 135.9 (*2), 136.2, 138.3 (*2), 139.8, 146.6, 146.9, 150.9 (*2), 160.4 (*2), 166.7 (C=O). ^{11}B NMR (192,5 MHz, CDCl_3): δ 1.24 (t, $^1J = 34.4$ Hz). ESI-MS: $m/z = 831.3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 847.3 $[\text{M}+\text{K}]^+$. UV-Vis λ_{max} (THF)/nm: 655 ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$: 96700), 606 (37700), 425 (11900), 369 (68700), 333 (30200), 317 (28000), 258 (24900).

Compounds 15 and 16. 60 μ L of tetraethyleneglycol monomethyl ether (307 μ mol) were added to a vigorously stirred suspension of aluminium trichloride (41 mg, 307 μ mol) and 50 mg of **14** (62 μ mol) in dry dichloromethane (15 mL). The mixture was stirred at room temperature for 30 min. The crude product was purified by silica gel column chromatography (dichloromethane/methanol 9:1) to obtain pure **15** (9 mg, yield = 15% yield) and pure **16** (40 mg, 54 % yield). Compound **15**: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.12 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.24 (s, 6H), 2.57 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.06 (t, $^3J_A = 7.3$ Hz, 2H), 3.32 (s, 3H), 3.20-3.55 (m, 16H), 3.78 (td, $^3J_A = 7.3$ Hz, $^3J_B = 5.8$ Hz, 2H), 3.83 (s, 6H), 6.53 (t, $^3J_B = 5.8$ Hz, 1H), 6.90 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H), 7.14 (d, $^3J = 16.9$ Hz, 2H), 7.30 (dd, $^3J_C = 7.9$ Hz, $^3J_D = 1.5$ Hz, 1H), 7.37 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 7.42 (dd, $^3J_C = 7.9$ Hz, $^3J_D = 1.5$ Hz, 1H), 7.55 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H), 7.72 (dd, $^3J_C = 7.9$ Hz, $^3J_D = 1.5$ Hz, 1H), 7.89 (d, $^3J = 16.8$ Hz, 2H), 7.90 (dd, $^3J_C = 7.9$ Hz, $^3J_D = 1.5$ Hz, 1H), 8.16 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H). ESI-MS: $m/z = 1019.5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Compound **16**: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.14 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.26 (s, 6H), 2.57 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.12 (t, $^3J_A = 7.1$ Hz, 2H), 3.31 (s, 6H), 3.35-3.75 (m, 32H), 3.79 (td, $^3J_A = 7.1$ Hz, $^3J_B = 5.9$ Hz, 2H), 3.83 (s, 6H), 6.39 (t, $^3J_B = 5.9$ Hz, 1H), 6.91 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 4H), 7.05 (d, $^3J = 16.9$ Hz, 2H), 7.43 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.44 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 7.56 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 4H), 7.86 (d, $^3J = 8.2$ Hz,

2H), 8.01 (d, $^3J = 16.9$ Hz, 2H), 8.19 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H). ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 2.58 (s). ESI-MS: $m/z = 1207.7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Notes

† Electronic Supplementary Information (ESI) available: [Instrumental, NMR data, XRay data of compound 3, absorption and emission spectra]. See DOI: 10.1039/b000000x/

Acknowledgements

CheMatech[®] is warmly thanked for the aminomethyl-13ane4. B.B. and C.B. thank the French Ministry of Research for PhD scholarships. Supports were provided by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université de Bourgogne and the Conseil Régional de Bourgogne through the 3MIM Project. Fanny Chaux, Marie José Penouilh and Marc Pirrota are acknowledged for technical support. PDH thanks the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

References

1. (a) R. P. Haugland, *Handbook of Molecular Probes and Research Products*; 9th ed.; Molecular Probes, 2002, **9th ed.**; Molecular Probes, Inc.: Eugene, OR. (b) G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2008, **47**, 1184. (c) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* 2007, **107**, 4891. (d) N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* 2012, **41**, 1130.
2. (a) T. Gareis, C. Huber, O. S. Wolfbeis, J. Daub, *Chem. Commun.* 1997, 1717. (b) M. Kollmannsberger, K. Rurack, U. Resch-Genger, J. Daub, *J. Phys. Chem.* 1998, **102**, 10211. (c) K. Rurack, M. Kollmannsberger, U. Resch-Genger, J. Daub, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**, 968. (d) S. Y. Moon, N. R. Cha, Y. H. Kim, S. K. Chang, *J. Org. Chem.* 2004, **69**, 181. (e) G. Ulrich, R. Ziessel, *Synlett.* 2004, 439. (f) G. Ulrich, R. Ziessel, *J. Org. Chem.* 2004, **69**, 2070. (g) G. Ulrich, R. Ziessel, *Tetrahedron Lett.* 2004, **45**, 1949.
3. A. B. Nepomnyashchii, A. Bard, *Acc. Chem. Res.* 2012, **45**, 1844.
4. A. Kamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* 2013, **42**, 77.
5. (a) S. Erten-Ela, D. Yilmaz, B. Icli, Y. Dede, S. Icli, E. U. Akkaya, *Org. Lett.* 2008, **10**, 3299. (b) T. Rousseau, A. Cravino, J. Roncali, T. Bura, G. Ulrich, R. Ziessel, *Chem. Commun.* 2009, 1673. (c) T. Rousseau, A. Cravino, J. Roncali, T. Bura, G. Ulrich, R. Ziessel, *J. Mater. Chem.* 2009, **16**, 2298. (d) D. Kumaresan, R. P. Thummel, T. Bura, G. Ulrich, R. Ziessel, *Chem. Eur. J.* 2009, **15**, 6335. (e) S. O. Kolemen, A. Bozdemir, Y. Cakmak, G. Barin, E. Erten, M. S. Marszalek, J. H.

- Yum, S. M. Zakeeruddin, M. K. Nazeeruddin, M. Grätzel, E. U. Akkaya, *Chem. Sci.* 2011, **2**, 949.
6. (a) C. Bernhard, C. Goze, Y. Rousselin, F. Denat, *Chem. Commun.* 2010, **46**, 8267. (b) C. Bernhard, M. Moreau, D. Lhenry, C. Goze, F. Boschetti, Y. Rousselin, F. Brunotte, F. Denat, *Chem. Eur. J.* 2012, **18**, 7834. (c) T. Kobayashi, T. Komatsu, M. Kamiya, C. Campos, M. Gonzales-Gaitan, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano, Y. Urano, *J. Am. Chem. Soc.* 2012, **134**, 11153. (d) Z. Li; T.P. Lin, S. Liu, C.W. Huang, T. W. Hudnall, F.P. Gabbai, P. S. Conti, *Chem. Commun.* 2011, **47**, 9324; (e) Y. Urano, D. Asanama, Y. Hama, Y. Koyama, T. Barrett, M. Kamuya, T. Nagano, T. Watamabe, A. Hasagawa, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Nat. Med.*, 2009, **15**, 104.
 7. S. Tasan, O. Zava, B. Bertrand, C. Bernhard, C. Goze, M. Picquet, P. Le Gendre, P. Harvey, F. Denat, A. Casini, E. Bodio, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 6102-6109.
 8. (a) Y. Ueno, J. Jose, A. Loudet, C. Perez-Bolivar, P. Anzenbacher, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**(1), 51. (b) S. Erbas-Cakmak, O. A. Bozdemir, Y. Cakmak, E. U. Akkaya, *Chem. Sci.* 2013, **4**(2), 858.
 9. (a) L. Bonardi, G. Ulrich, R. Ziessel, *Org. Lett.* 2008, **10**, 2183. (b) Y. Chen, J. Zhao, L. Xie, H. Guo, Q. Li, *RSC Advances*, 2012, **2**, 3942. (c) C. Thivierge, J. Han, R. M. Jenkins, K. Burgess, *J. Org. Chem.* 2011, **76**(13), 5219.
 10. (a) T. Rohand, W. Qin, N. Boens, W. Dehaen, *Eur. J. Org. Chem.* 2006, **20**, 4658. (b) M. Baruah, W. Qin, N. Basaric, W. M. De Borggraeve, N. Boens, *J. Org. Chem.* 2005, **70**, 4152. (c) L. Jiao, J. Li, S. Zhang, C. Wei, E. Hao, M. Vicente, *New J. Chem.* 2009, **33**, 1888. (d) D. W. Domaille, L. Zeng, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, **132**, 1194. (e) V. Leen, E. Braeken, K. Luckermans, C. Jackers, M. Van der Auweraer, N. Boens, W. Dehaen, *Chem. Commun.* 2009, **45**, 4515. (f) L. Jiao, C. Yu, M. Liu, Y. Wu, K. Cong, T. Meng, Y. Wang, E. Hao, *J. Org. Chem.* 2010, **75**, 6035. (g) L. Li, B. Nguyen, K. Burgess, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, **18**, 3112. (h) Ö. Dilek, S. L. Bane, *Tetrahedron Lett.* 2008, **49**, 1413. (i) G. Ulrich, R. Ziessel, A. Haefele, *J. Org. Chem.* 2012, **77**, 4298. (j) J. Han, O. Gonzales, A. Aguilar-Aguilar, E. Pena-Cabrera and K. Burgess, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 34.
 11. (a) C. Goze, G. Ulrich, R. Ziessel, *J. Org. Chem.* 2007, **72**, 313. (b) C. Goze, G. Ulrich, R. Ziessel, *Org. Lett.* 2006, **8**, 4445. (c) R. Ziessel, C. Goze, G. Ulrich, *Synthesis*, 2007, 936. (d) C. Goze, G. Ulrich, L. J. Mallon, B. D. Allen, A. Harriman, R. Ziessel, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 10231.
 12. C. Tahtaoui, C. Thomas, F. Rohmer, P. Klotz, G. Duportail, Y. Mely, D. Bonnet, M. Hibert, *J. Org. Chem.* 2007, **72**, 269.
 13. (a) R. Ziessel, G. Ulrich, A. Harriman, *New J. Chem.* 2007, **31**, 496. (b) B. Brizet, A. Eggenpiller, C. P. Gros, J. M. Barbe, C. Goze, F. Denat, P. D. Harvey, *J. Org. Chem.* 2012, **77**, 3646. (c) Y. Tokoto, A. Nagai, Y. Chujo, *Tetrahedron Lett.* 2010, **51**, 3451; (d) M. E. El-Khouly, C. A. Wijesinghe, V. N. Nesterov, M. E. Zandler, S. Fukuzumi and F. D'Souza, *Chem.-Eur. J.*, 2012, **18**, 13844.

14. (a) B. Brizet, A. Eggenspileer, C. Gros, J. M. Barbe, C. Goze, F. Denat and P. D. Harvey, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 3646; (b) M. E. El-Khouly, C. A. Wijesinghe, V. N. Nesterov, M. E. Zandler, S. Fukuzumi and F. D'Souza, *Chem.-Eur. J.*, 2012, **18**, 13844.
15. (a) T. Lundrigan, S. M. Crawford, T. S. Cameron and A. Thompson, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 1003; (b) T. Lundrigan and A. Thompson, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 757.
16. **Crystal Data for 3:** C₃₉H₃₉N₂O₆B, M = 642.53, triclinic, space group *P*-1 (no. 2), a = 10.8262(3) Å, b = 12.7507(4) Å, c = 14.1556(4) Å, α = 86.5400(10)°, β = 68.923(2)°, γ = 65.630(2)°, V = 1651.94(9) Å³, Z = 2, T = 115(2) K, μ(Mo-Kα1) = 0.086 mm⁻¹, D_{calc} = 1.292 g/mm³, 14266 reflections measured (3.1 ≤ 2Θ ≤ 55.06), 7527 unique (R_{int} = 0.0305) which were used in all calculations. The final R1 was 0.0521 (I > 2σ(I)) and wR2 was 0.1172 (all data). The minimum and maximum residual electron densities are -0.224 and 0.314 e Å⁻³. CCDC-931678 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/L.
17. O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard and H. Puschmann, *J. Appl. Crystallogr.*, 2009, **42**, 339.
18. L. Lattuada, A. Barge, G. Cravatto, G. Battista Giovenzana, L. Tei, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 3019-49.
19. Y. Rousselin, N. Sok, F. Boschetti, F. Denat, *Eur. J. Org. Chem.* 2010, **9**, 1688.
20. S. Zhu, J. Zhang, G. Venesga, F.-T. Luo, S. A. Green and H. Liu, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 438.
21. S. L. Niu, C. Massif, G. Ulrich, P. Y. Renard, A. Romieu, R. Ziessel, *Chem. Eur. J.* 2012, **18**, 7229.
22. S. Luo, E. Zhang, Y. Su, T. Cheng, C. Shi, *Biomaterials*, 2011, **32**, 7127.
23. O. A. Bozdemi, R. Guliyev, O. Buyukcakil, S. Selcuk, S. Kolenen, G. Gulseren, T. Nalbantoglu, H. Boyaci, E. U. Akkaya, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8209.
24. W. Bauml, A. Penzkofer, *Chem. Phys.* 1990, **140**, 75.
25. F. P. Schäfer, F.P. *In Topics in Applied Physics: Structure and Properties of Laser Dyes*; Springer-Verlag: Berlin, 1990, **Vol. 1**.
26. (a) A. Coskun, E. U. Akkaya, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 14474. (b) A. Coskun, E. U. Akkaya, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 10464.

1.3 Données supplémentaires

1.3.1 Essais pour introduire un macrocycle sur un BODIPY par *O*-fonctionnalisation.

Dans l'article 1, nous avons vu que la réduction des deux fonctions aminal du composé **10** n'a pas permis d'accéder au composé bodipy-bismacrocycle ciblé. D'autres voies d'accès à un *O*-BODIPY porteur de deux macrocycles sur l'atome de bore ont cependant été explorées. Nous détaillons ici deux d'entre elles.

Tout d'abord, il a été envisagé d'introduire une fonction phénol sur un macrocycle dérivé du 13aneN4 puis de réaliser la *O*-fonctionnalisation en dernière étape. La synthèse du macrocycle a été réalisée par condensation du 4-hydroxybenzaldéhyde sur l'amine secondaire du macrocycle. Comme décrit dans l'article, la formation de la base de Schiff attendue n'est pas observée.¹⁴⁷ L'intermédiaire obtenu est un aminal exocyclique, favorisé par la formation d'un cycle stable à six chaînons¹⁴⁸, comme le montre le Schéma 4. L'ouverture de la fonction aminal est réalisée par le borohydrure de sodium, et conduit au macrocycle fonctionnalisé par la fonction phénol désirée **A1** avec un rendement global de 29 %.

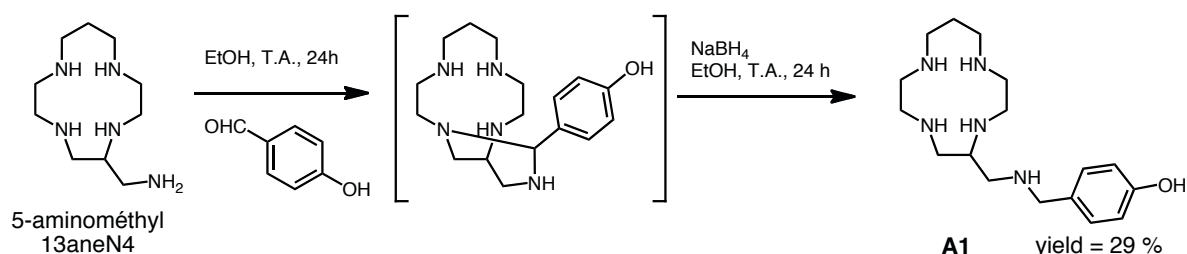


Schéma 4

L'étape de *O*-fonctionnalisation du bodipy **1** avec le macrocycle **A1** n'a cependant pas permis d'accéder au composé désiré; les composés de départ n'ayant pas réagi.

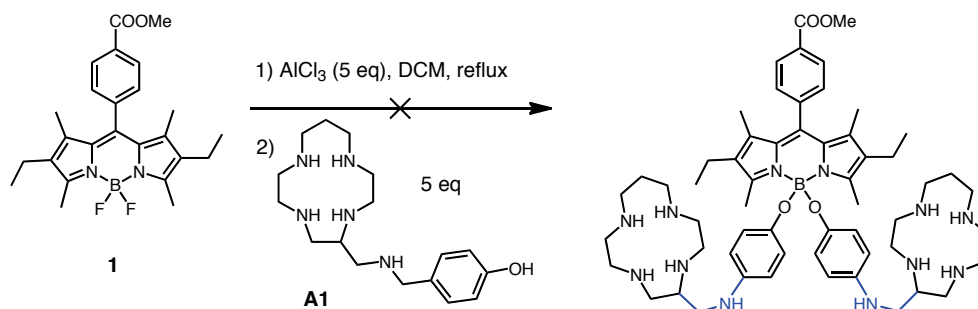


Schéma 5

Suite à ces échecs, nous avons envisagé une autre voie d'accès à un *O*-BODIPY fonctionnalisé par deux macrocycles dérivés du 13aneN4. Elle implique l'introduction préalable de fonctions acide carboxylique, l'objectif étant de réaliser à terme un couplage peptidique avec le macrocycle dérivé du 13aneN4 (cf Schéma 6).

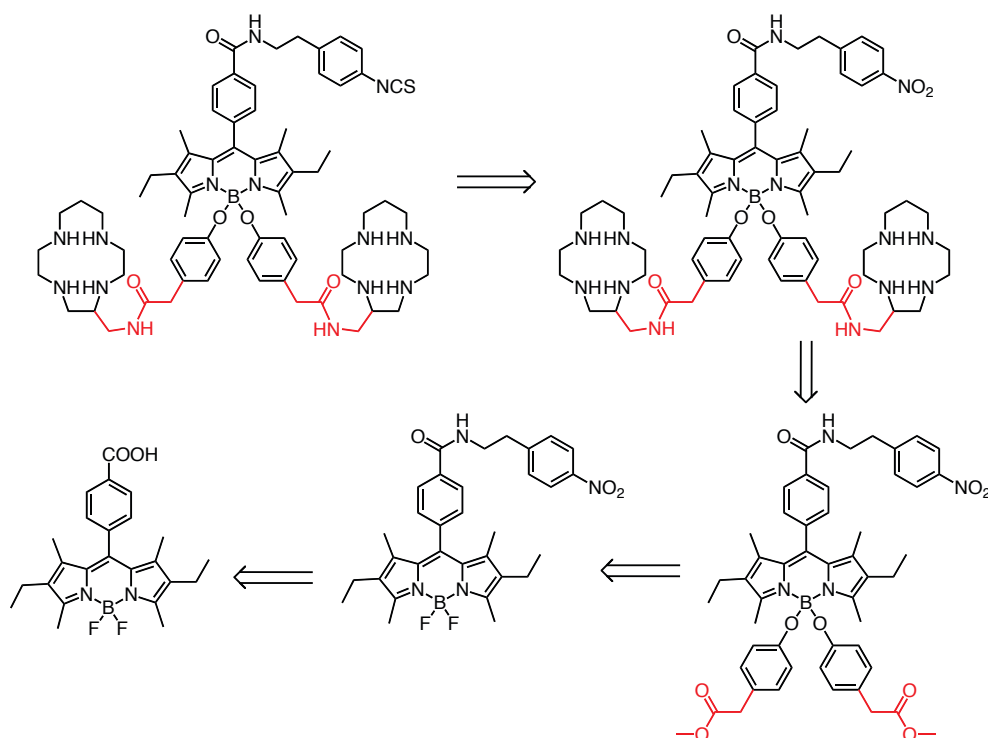


Schéma 6

Afin de réaliser sélectivement la saponification des deux fonctions ester portées par l'atome de bore, un groupe nitrobenzyle a été introduit en position *meso*. Le groupement nitro peut être ultérieurement transformé en fonction isothiocyanate par hydrogénolyse catalysée au palladium sur charbon, puis activation de l'amine en présence de thiophosgène. Le composé **9** porteur de deux fonctions ester méthylique a

pu être isolé avec un rendement de 38 %, mais nous avons ensuite rencontré des problèmes lors de l'étape de saponification (Schéma 7).

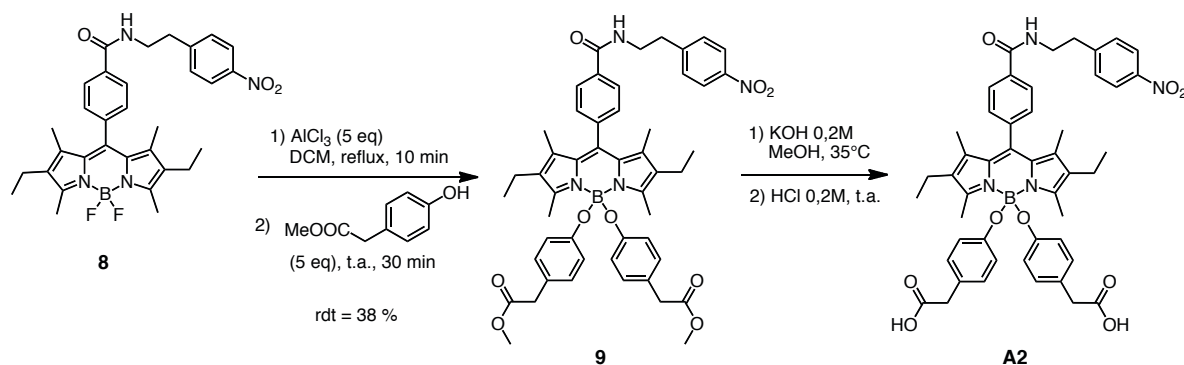


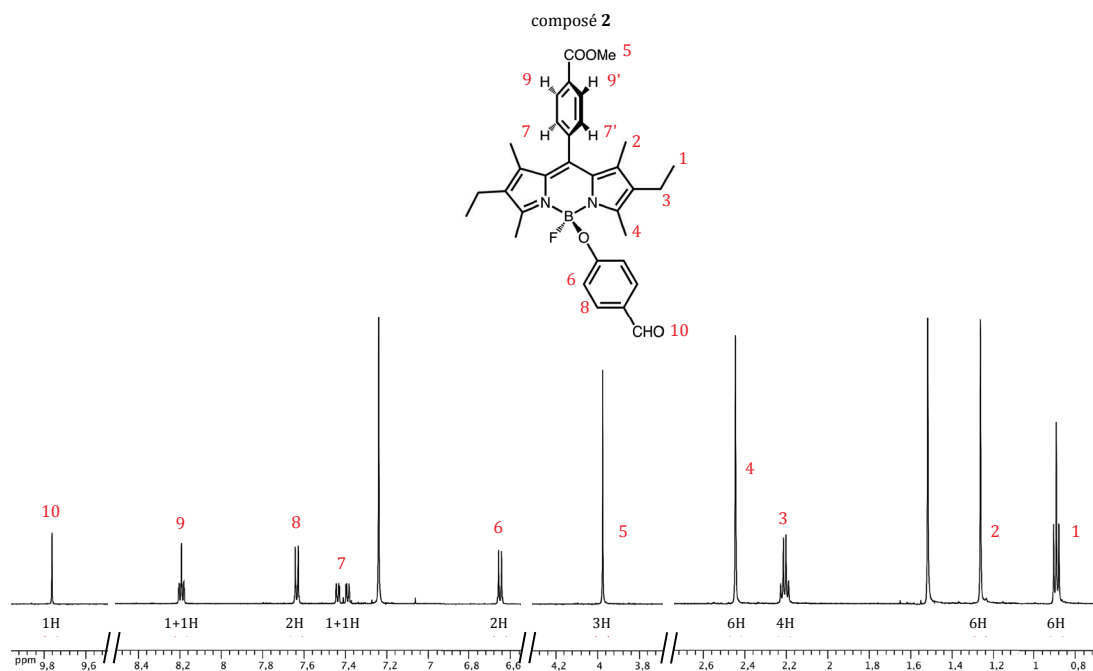
Schéma 7

En effet, même si la formation du diacide **A2** a été mise en évidence par spectrométrie de masse, de nombreuses impuretés se sont formées au cours de la réaction. La migration lente du diacide sur colonne chromatographique (silice et alumine) due à sa forte polarité ont rendu délicate sa purification. Il n'est pas exclu que des produits secondaires de type B-OH se forment au cours de la saponification.

Ces tentatives infructueuses d'introduction du 5-aminométhyl-13aneN4 sur l'atome de bore démontrent que la post-fonctionnalisation des *O*-BODIPY est délicate, notamment lorsque la transformation de groupes réactionnels nécessitent des conditions particulières comme l'utilisation de NaBH₄, d'acides ou de bases.

1.3.2 *O*-BODIPY disymétriques.

Il est intéressant de relever que les produits de monofonctionnalisation **2** et **15** sont des BODIPY dont chacune des deux faces du cycle indacène sont différenciées, ce qui a pu être mis en évidence par spectroscopie RMN. La Figure 46 montre le spectre RMN ¹H du composé **2**. La rotation du cycle aromatique en position *meso* est entravée par la présence des groupements méthyles sur les positions β-pyrroliques. Les deux noyaux d'hydrogène de chacune des deux positions ortho et meta peuvent donc être différenciés lorsque l'atome de bore porte deux substituants différents. Par conséquent, on observe un doublet d'intensité 1 pour chacun des quatre noyaux d'hydrogène en positions 7 et 7' (7.37 et 7.44 ppm) et 9 et 9' (8.18 et 8.20 ppm) (Figure 46).

Figure 46 : spectre RMN ^1H du composé **2** (500 MHz, CDCl_3 , 323 K).

1.4 Conclusion

La méthode de *O*-fonctionnalisation des BODIPY permet d'introduire de manière sélective différents groupements réactifs parmi lesquels des amines et des dérivés carbonylés au niveau de l'atome de bore. De nouveaux *O*-BODIPY ont ainsi pu être synthétisés et étudiés. Les paramètres d'absorption et d'émission de ces composés (longueurs d'onde d'absorption et d'émission, coefficients d'absorption molaire, rendements quantiques et temps de vie de fluorescence) restent comparables à ceux de leurs précurseurs difluorés. La formation de liaisons B-O n'affecte pas la forte fluorescence des BODIPY.

Cette méthode de fonctionnalisation de l'atome de bore s'avère une stratégie efficace pour l'introduction, en une étape, de groupements hydrosolubilisants tels que des groupements polyéthylèneglycol. La formation de certains produits secondaires au cours de la réaction (groupements hydroxy, méthoxy ou éthoxy sur l'atome de bore) mise en évidence à plusieurs reprises permet d'expliquer les rendements de réaction modérés. Différentes stratégies ont été employées pour introduire deux tétraazamacrocycles sur un BODIPY par *O*-fonctionnalisation se sont soldées par des échecs. La post-fonctionnalisation des *O*-BODIPY s'avère parfois délicate, et une attention particulière doit être apportée aux conditions réactionnelles des étapes suivant la *O*-fonctionnalisation. Notons enfin que des *O*-BODIPY fonctionnalisés par deux dérivés porphyriniques ont pu être obtenus avec de bons rendements. La synthèse et les caractérisations photophysiques de ces systèmes seront détaillées dans le chapitre III.2.

Contributions à l'article I

Le Dr. Christine Goze est à l'origine de l'inspiration qui a conduit à ces travaux de recherche. Franck Denat et Pierre D. Harvey ont aidé à interpréter les résultats.

Les différents travaux visant l'introduction sur l'atome de bore d'un macrocycle dérivé du 13aneN4 ont débuté lors de la thèse du Dr. C. Bernhard. Ils ont permis la synthèse et la caractérisation des nouveaux composés **3** et **10**. La réduction du composé **10** n'a cependant pas permis d'accéder au produit désiré. J'ai réalisé à nouveau cette synthèse, confirmant que la réduction des fonctions aminal du composé **10** en présence de borohydrure de sodium n'avait pas lieu. A cette occasion, j'ai isolé le composé **11**. Avec l'objectif de trouver d'autres moyens d'introduire le macrocycle sur le BODIPY par *O*-fonctionnalisation, mais aussi de greffer des groupements hydrosolubilisants, j'ai synthétisé et caractérisé les composés **8**, **9**, **14** et **16**. Notons que j'ai également pu isoler les composés **2** et **15** (*O*-BODIPY monofonctionnalisés) au cours de ce travail. Les composés **4**, **6** et **12** ont été synthétisés et caractérisés par Yulia Volkova, stagiaire post-doctorale dans notre laboratoire. Yoann Rousselin a déterminé la structure cristallographique du composé **3**.

A l'Université de Sherbrooke, j'ai réalisé les études photophysiques des différents composés cités dans l'article. Les résultats sont donnés dans le tableau 1 et les figures 3 et 4.

Concernant la rédaction de l'article, j'ai participé à la rédaction des différentes parties du manuscrit, avec une contribution principale pour la rédaction de la partie « résultats photophysiques », et du « supporting information ». Christine Goze, Claire Bernhard, Franck Denat et Pierre D. Harvey ont participé à la rédaction ainsi qu'à la correction de l'article.

2 Nouveaux synthons BODIPY-DMAP pour l'imagerie bimodale optique/TEP

2.1 Introduction à l'article II

2.1.1 Revue de littérature concernant les [^{18}F]BODIPY

La majorité des MOMIA décrits pour l'imagerie bimodale optique/nucléaire comportent un agent chélatant permettant de complexer un radiométal.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Il existe peu d'exemples de MOMIA dans lesquels le radioélément est lié par liaison covalente au reste de la molécule, comme par exemple le Cy 7.5- ^{18}F -Lymphoseek (chapitre I.3.2.2). Ces systèmes possèdent pourtant l'avantage de posséder une structure simple et de faible poids moléculaire, permettant *a priori* de modifier au minimum les propriétés de liaison du vecteur avec sa cible. Dans notre démarche d'élaboration de sondes bimodales optique/TEMP ou TEP à base de BODIPY, nous avons cherché à développer de nouveaux synthons BODIPY permettant d'être marqués par un radioélément. Peu d'exemples de ce type existent dans la littérature. Citons les travaux de l'équipe de Ono qui a élaboré un système BODIPY- ^{125}I destiné à imager les plaques β -amyloïde pour la détection de la maladie d'Alzheimer (Schéma 8).¹⁵²

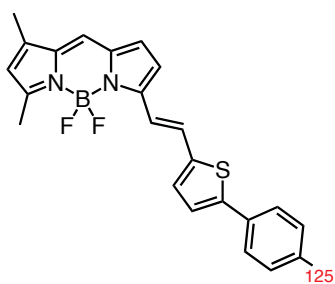
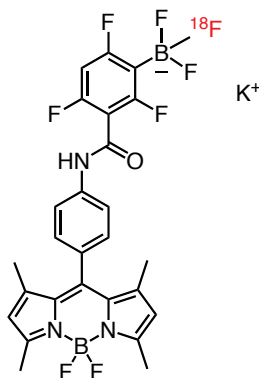


Schéma 8

Citons également les travaux du groupe de Perrin qui a élaboré un système BODIPY- ^{18}F en utilisant un groupe aryltrifluoroborate pour l'introduction du radioélément.¹⁵³

Figure 47 : BODIPY- ^{18}F élaboré par Ting et al.¹⁵³

Le fluor 18 est le radionucléide le plus utilisé en imagerie TEP, en grande partie grâce au développement du $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ pour l'imagerie clinique. Il possède un temps de demi-vie (110 min) suffisamment long pour réaliser le radiomarquage du radiotraceur suivi de l'examen d'imagerie. Il existe de nombreuses stratégies de radiofluoration, décrites dans plusieurs revues.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷ Certaines d'entre elles consistent à former une liaison B-F, connue pour être thermodynamiquement très stable.¹⁵⁸ Pour le BODIPY- ^{18}F dont la structure est donnée dans la Figure 47 par exemple, un groupement prosthétique de type aryltrifluoroborate est utilisé pour l'introduction du fluor 18. Plus récemment, des stratégies utilisant le fragment BF_2 du BODIPY, et ne nécessitant aucun groupement prosthétique, ont été développées.

- C'est le groupe de Gabbaï qui a publié en 2008 les premiers travaux sur la fluoration de BODIPY portant un groupement partant sur l'atome de bore.¹⁵⁹ Deux approches ont été décrites. Dans la première, le BODIPY réagit avec du triflate de triméthylsilyle et un intermédiaire de type B-OTf est isolé. Notons que seul le produit de monosubstitution est observé, bien que deux équivalents de TMSOTf soient utilisés. L'intermédiaire de type B-OTf réagit ensuite avec la diméthylaminopyridine (DMAP) pour conduire au dérivé B-DMAP avec un rendement de 82 %. Le dérivé B-DMAP obtenu présente l'avantage d'être stable en présence d'eau, contrairement au dérivé B-OTf qui s'hydrolyse facilement. Il réagit quantitativement et instantanément avec le fluorure de tétra-*n*-butylammonium pour former le dérivé BF_2 (Schéma 9). Notons que le dérivé B-DMAP peut être synthétisé directement à partir du dérivé BF_2 en réalisant les deux premières étapes "one pot", dans le toluène.

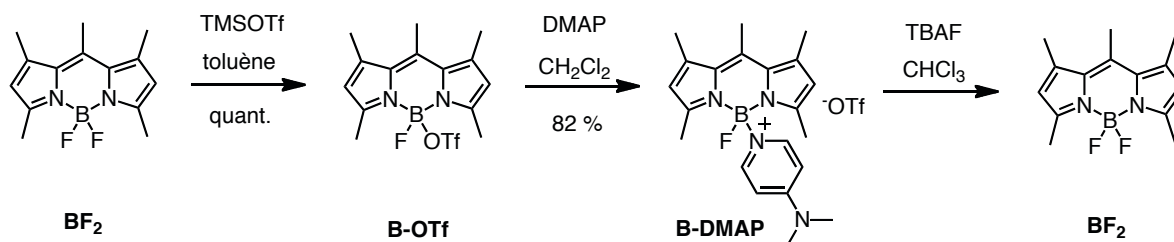


Schéma 9

■ La seconde approche décrite dans la littérature implique la synthèse d'un intermédiaire de type B-OH.¹⁶⁰ Afin d'éviter l'introduction de deux groupements hydroxyles sur l'atome de bore, un dérivé Ph-B-Cl est d'abord synthétisé. La liaison B-C est en effet très stable, contrairement à la liaison B-Cl qui s'hydrolyse facilement pour former le dérivé ciblé Ph-B-OH.¹⁶⁰ Le dérivé B-OH possède néanmoins une faible réactivité vis-à-vis des agents fluorants : la fluoration en présence de bifluorure de potassium (KHF₂) est réalisée en 24 h, temps beaucoup trop long pour envisager une radiofluoruration (Schéma 10).

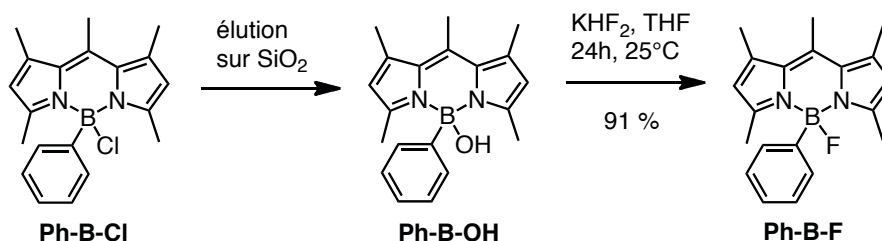


Schéma 10

■ En collaboration avec Peter S. Conti, le groupe de Gabbaï réalise, en 2011, la première radiofluoruration d'un BODIPY.¹⁶¹ Un BODIPY de type Ph-B-OH est utilisé; il porte une fonction triflate d'ammonium en position *meso* qui permet de le rendre hydrosoluble. Les conditions de radiofluoruration ont été optimisées afin d'accélérer la réaction. [¹⁸F]KHF₂ est utilisé en milieu acide dans un mélange H₂O/MeOH. Le rendement est amélioré en travaillant en milieu anhydre, et en pré-traitant le BODIPY avec une solution de TMSOTf avant de réaliser la radiofluoruration en présence de [¹⁸F]TBAF (Schéma 11). Ces travaux montrent également que le fragment BF₂ est métaboliquement stable puisqu'aucune trace de ¹⁸F libre n'est détectée chez la souris.

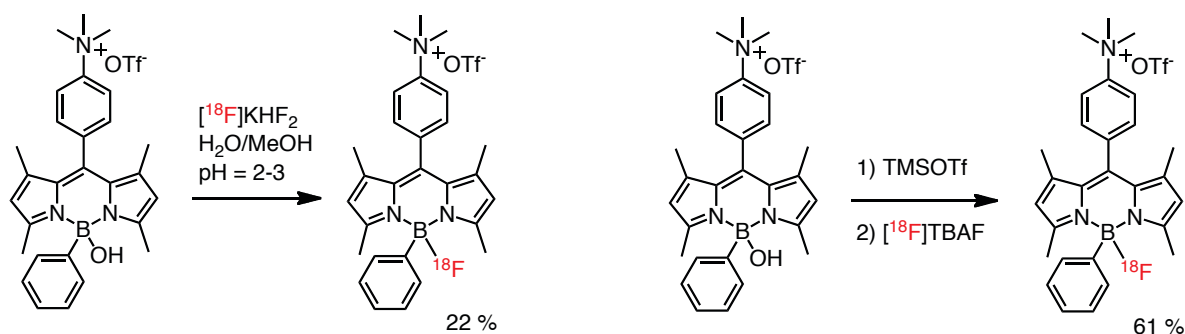


Schéma 11

■ En 2012, le groupe de Weissleder et Mazitschek réalise pour la première fois le greffage d'un BODIPY B- $[^{18}\text{F}]$ sur une biomolécule.¹⁶² La radiofluoruration est réalisée "one-pot" : un intermédiaire de type B-OTf est généré avant l'ajout de $^{18}\text{F}/\text{TBAB}$ (tétra-*n*-butylammonium bromide). La bioconjugaison est réalisée en dernière étape sur le trastuzumab, un anticorps ciblant les récepteurs HER2 surexprimés dans les cellules tumorales de nombreux types de cancers, notamment du cancer du sein (Schéma 12). On peut cependant se questionner sur les applications envisageables pour un anticorps comme le trastuzumab radiomarké au fluor 18. En effet, le temps de demi-vie de 110 min du fluor 18 est très court pour pouvoir réaliser à la fois le radiomarquage, la bioconjugaison puis l'examen d'imagerie TEP. Le trastuzumab est un anticorps entier, et son accumulation à la surface des cellules cancéreuses est relativement lente.¹⁶³ Une approche de pre-targeting serait probablement plus adaptée au radiomarquage de cet anticorps.

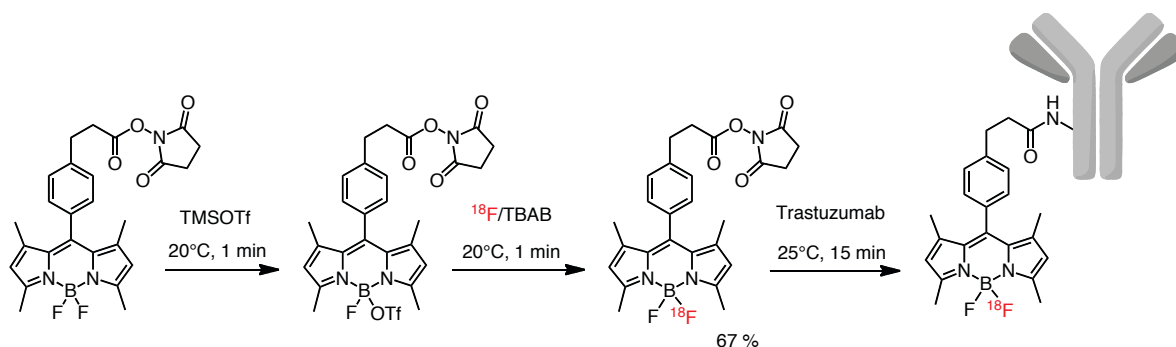


Schéma 12

Au cours de ces travaux, la radiofluoruration d'un BODIPY-DMAP est également réalisée (Schéma 13). Cette approche n'a cependant pas été retenue pour la synthèse du BODIPY bioconjugué car la fonction NHS ne résiste pas aux conditions de radiofluoruration nécessaires pour substituer la DMAP (chauffage par micro-ondes dans le DMF à 100°C).

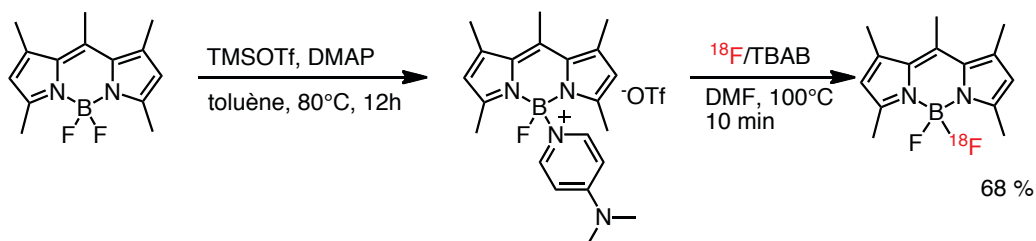


Schéma 13

■ En 2013, les groupes de Gabbaï et de Conti testent plusieurs conditions de radiofluoration « one-pot » en présence d'un acide de Lewis.¹⁶⁴ Parmi les différents acides de Lewis testés, le tétrachlorure d'étain (SnCl_4) donne les meilleurs résultats. Un BODIPY radiomarqué, puis bioconjugué à un dérivé du RGD est obtenu en deux étapes et est injecté à une souris porteuse d'une tumeur. Le traceur s'accumule principalement au niveau des reins, du foie, et de la zone tumorale.

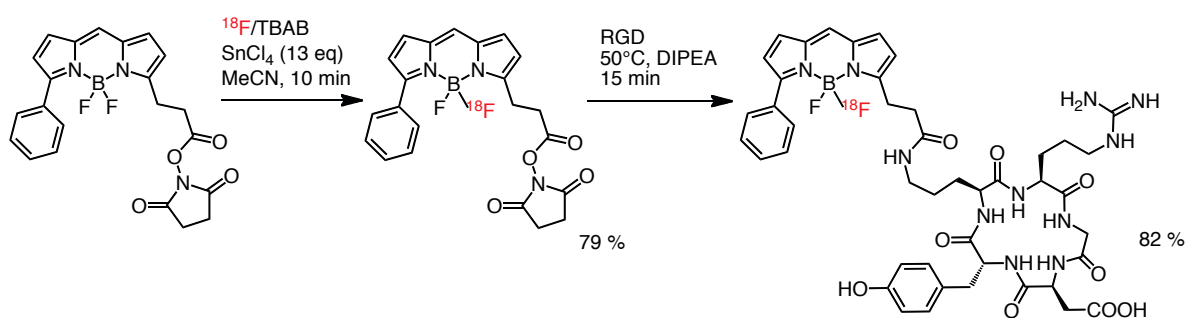


Schéma 14

■ Notons que les $[^{18}\text{F}]$ -BODIPY ont très récemment été utilisés pour des examens de perfusion myocardique sur le petit animal, par les groupes de Gabbaï et de Conti, ainsi que par le groupe de Josephson.^{165,166}

On peut donc distinguer trois approches pour la radiofluoration de BODIPY. Les deux premières impliquent la synthèse préalable d'un BODIPY porteur d'un groupe partant (Ph-B-OH ou B-DMAP) qui est ensuite radiofluoré lors d'une seconde étape. La troisième approche est réalisée "one pot", en présence d'un agent activant (TMSOTf ou SnCl_4).

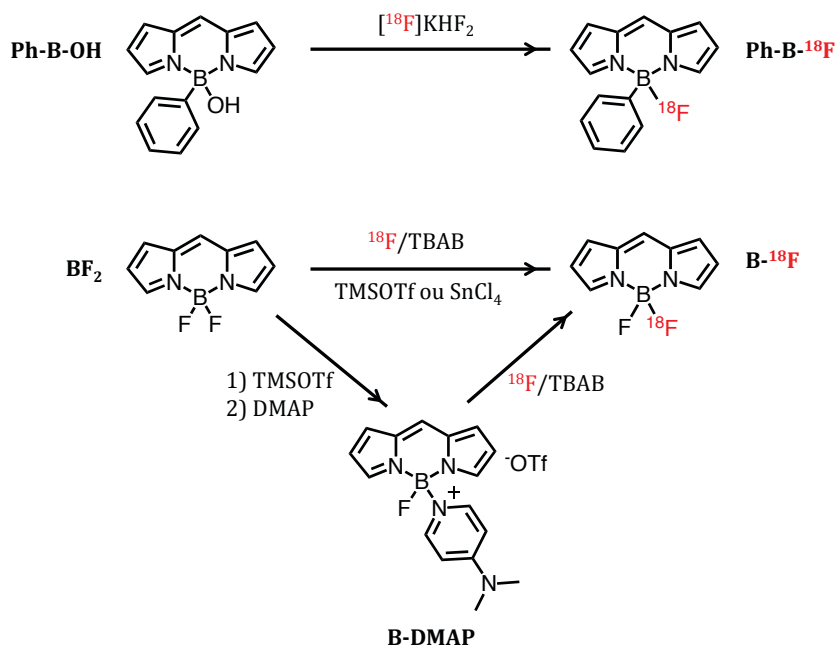


Figure 48 : les trois voies décrites pour la radiofluorination de BODIPY.

Notons également que pour les deux $[^{18}\text{F}]$ -BODIPY bionconjugués décrits précédemment, la radiofluorination a été réalisée en avant-dernière étape, la dernière étape étant l'étape de bioconjugaison. Cette dernière dure environ une trentaine de minutes, si l'on compte le temps de réaction et le temps de purification.

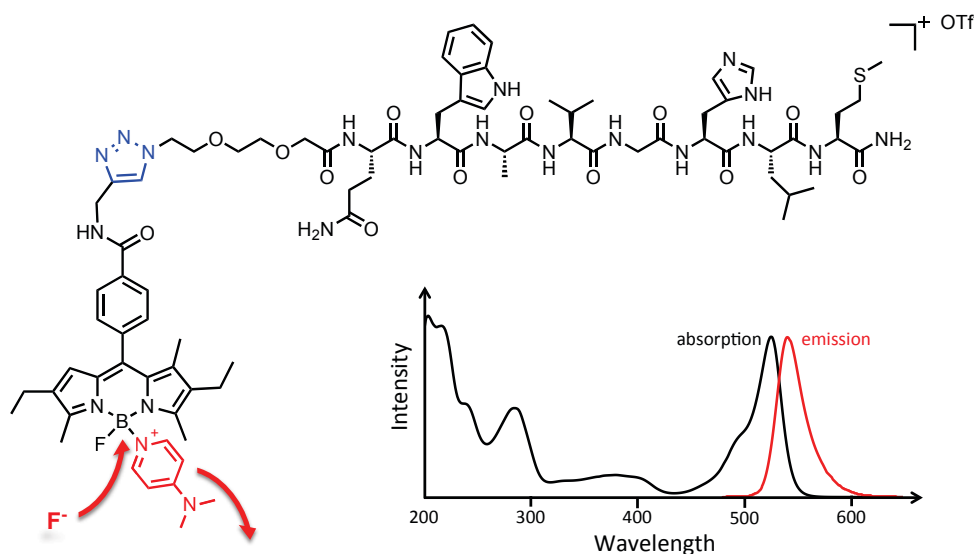
2.1.2 Objectifs

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à développer des synthons BODIPY potentiellement radiomarquables au fluor 18 après l'étape de bioconjugaison. Nous avons réalisé dans un premier temps des tests de fluoration "à froid", en nous plaçant dans des conditions réactionnelles similaires à celles utilisées en radiofluorination afin de valider notre approche. Nous avons choisi d'utiliser la méthodologie impliquant des intermédiaires de type B-DMAP pour plusieurs raisons :

- Les intermédiaires de type B-DMAP ne sont pas sensibles à l'hydrolyse. Ils peuvent être isolés et manipulés facilement, à la différence des intermédiaires de type B-OTf par exemple.
- Le dérivé de type Ph-B-OH est sensible à certaines conditions réactionnelles, notamment en milieu acide. Certaines réactions de post-fonctionnalisation, comme par exemple l'introduction de groupements styryles, ne peuvent donc pas être envisagées avec cette approche. Les dérivés B-DMAP sont également sensibles à ce type de conditions réactionnelles, mais l'introduction de la DMAP peut être réalisée par fonctionnalisation du BODIPY-BF₂ déjà porteur de groupements styryles.

- La fluoration d'un dérivé B-DMAP peut facilement être suivie par RMN du bore, ou par spectrométrie de masse. En revanche, ce suivi est impossible pour les techniques "one pot". Pour ces méthodes, le suivi n'est possible qu'en radiofluorination, par mesure de l'activité spécifique du dérivé B-[^{18}F].

Résumé de l'article II.



Plusieurs BODIPY-DMAP précurseurs pour l'imagerie bimodale optique/TEP ont été synthétisés, et leurs propriétés photophysiques ont été étudiées. Un dérivé de la bombésine a été greffé par plusieurs synthons BODIPY-DMAP, puis des études d'affinité vis-à-vis des récepteurs-cible ont été réalisées. Des essais de fluoration de différents synthons BODIPY-DMAP, y compris après greffage sur la bombésine, ont permis d'apporter une preuve de concept. Les modifications chimiques réalisées sur ces BODIPY, permettant un décalage de leur domaine d'émission et d'absorption dans la fenêtre thérapeutique, en font des précurseurs prometteurs pour des applications comme agents d'imagerie bimodaux optique/TEP.

DMAP-BODIPYs alkynes: a convenient tool for labelling biomolecules for bimodal PET-optical imaging

Bertrand Brizet^[a,b], Victor Goncalves^[a], Claire Bernhard^[a], Yoann Rousselin^[a],
Pierre D Harvey^[b], Franck Denat^{*[a]}, Christine Goze^{*[a]}

[a] *Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, Université de Bourgogne, France.*

[b] *Département de Chimie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.*

Submitted in *Chemistry – A European Journal*, as a full paper.

Synopsis. Different BODIPY-DMAP compounds could be synthesized, as precursors for PET-optical imaging. Biolabelling was performed on bombesin peptide, while preserving the DMAP leaving group on the boron atom and the affinity for bombesin receptors. Extension of the conjugation on the BODIPY core was also investigated, for future *in vivo* imaging applications.

Abstract

Several new DMAP-BODIPY assemblies (DMAP = *N,N*-dimethylaminopyridine) were synthesized as precursors for bimodal imaging probes (Optical Imaging (OI)/Positron Emission Tomography (PET)). The photophysical properties of the new compounds were also studied. The first proof-of-concept was obtained with the preparation of several novel BODIPY-labelled bombesins and the evaluation of the affinity for bombesin receptors on a competition binding assay. Fluorination reactions were investigated on DMAP-BODIPY precursors as well as on DMAP-BODIPY labelled bombesins. Chemical modifications of the BODIPY core were also performed in order to obtain NIR luminescent dyes suitable for *in vivo* imaging, making these compounds promising precursors for PET/optical dual-modality imaging agents.

Introduction

Molecular imaging is a highly promising field of research and innovation with huge potential in a wide range of applications including prognostic, diagnostic, drug discovery and development of theranostics. It enables real-time visualization of biochemical events at the cellular and molecular levels within the cells, tissues and intact subjects.^[1] In this area of research, nuclear imaging, namely positron emission tomography (PET), enables non-invasive diagnosis with high sensitivity by providing *in vivo* distribution of radiolabeled biovectors, thus facilitating detection of cancers. Among the radioelements available for PET imaging, ¹⁸F has become the radionuclide of choice, in a similar way to ^{99m}Tc in gamma scintigraphy.^[2] This interesting trait is due to its optimal nuclear and chemical properties, i.e. low energy, high abundance, and relatively long lifetime (109.7 min) when compared to ¹¹C.^[3]

Fluorescence imaging is a valuable technique for small animal imaging. The optical agents also provide the opportunity to perform histological studies based on fluorescent signal to evidence molecular targeting. Clinical applications are unfortunately more limited owing to their poor penetrability in the tissues. Nevertheless, recent advances in fluorescence imaging instrumentation and probe developments promise new opportunities, highlighting the emerging performances of this technique, especially for fluorescence guided-surgery with targeted molecular imaging.^[4]

Together, PET and fluorescence imaging have complementary features, e.g. the high penetrability of nuclear modality and the high spatial and temporal resolution of fluorescence. These are some of the reasons why using dual-modality PET/Optical imaging could strongly be beneficial for preclinical and clinical applications.^[5] In this context, the preparation of MOMIA (MonoMolecular Imaging Agents), which combine a fluorescent probe and a radioisotope into a single moiety, showed marked advantages compared to the conventional approach (i.e. sequential coupling of a chelator and a NIR fluorophore).^[6] Noteworthy, the modification of biomolecules on one single attachment

point simplifies the dual labelling process and minimizes the loss of affinity for the targeted receptors.^[7]

Among the fluorescent dyes, BODIPY derivatives are highly suitable candidates for the design of bimodal agents as they generally provide high fluorescence quantum yields,^[8] high thermal and photochemical stability, and a high degree of tuneable emission into the NIR region from a simple variation of the molecular structure.^[8b, 9] Moreover, the BODIPY core bears two fluorine atoms onto its boron centre (BF₂ unit), ideal site for radiofluorination, considering the strength of the B-F bond ($> 730 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), which is one of the most thermodynamically stable covalent bonds known.^[10]

The high potential of ¹⁸F-BODIPY dyes has recently been investigated and different methods have been developed for ¹⁸F fluorination of BODIPY.^[11] Indeed, rapid nucleophilic [¹⁸F] radiolabeling of BODIPY dyes using a B-OH BODIPY precursor was previously reported by Gabbaï and Conti.^[12] B-OH BODIPY was pretreated with trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf) as an activating/water removing agent, followed by radiofluorination.^[13] This convenient approach was also exploited by Weissleder and Mazitschek who employed a BF₂-BODIPY dye as starting material.^[14] They also performed radiofluorination of DMAP(*N,N*-dimethylaminopyridine)-BODIPY precursors.^[15] More recently, Lewis acids such as SnCl₄ were also used to promote the ¹⁸F labelling via a ¹⁹F-¹⁸F exchange reaction.^[11,16] Additionally, *in vivo* stability of the B-¹⁸F bond was investigated. No release of free ¹⁸F⁻ was detected, proving the metabolic stability of the BF₂ core.^[13-14]

Our research group has explored the possibility to expand the library of potential bimodal imaging probes based on [¹⁸F]-BODIPY derivatives using our long-standing experience in the field of BODIPY synthesis, including NIR emitting systems.^[17] Moreover in our previous reports, we investigated the synthesis and the performances of BODIPY-chelators systems for bimodal SPECT/Optical imaging.^[18] In these systems, the radiolabeling is performed after bioconjugation, in the last synthetic step. We were thus very interested in the possibility of using a similar strategy, i.e. the introduction of ¹⁸F atoms during the final step.^[19] This approach has never been explored with [¹⁸F]-BODIPY derivatives before. More particularly, we focused on a leaving group, which i) could be stable under the bioconjugation coupling conditions, ii) could allow ¹⁸F labelling without using any additional reagent, such as a Lewis acid, considering the fragility of biomolecules, notably proteins. In order to fulfil these conditions, we used Weissleder's procedure, which replaces a DMAP group by ¹⁸F on BODIPY without any other reagent (Figure 1).^[14]

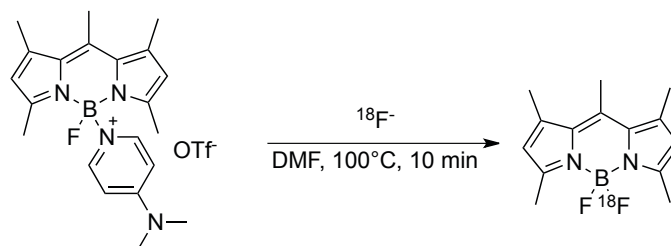
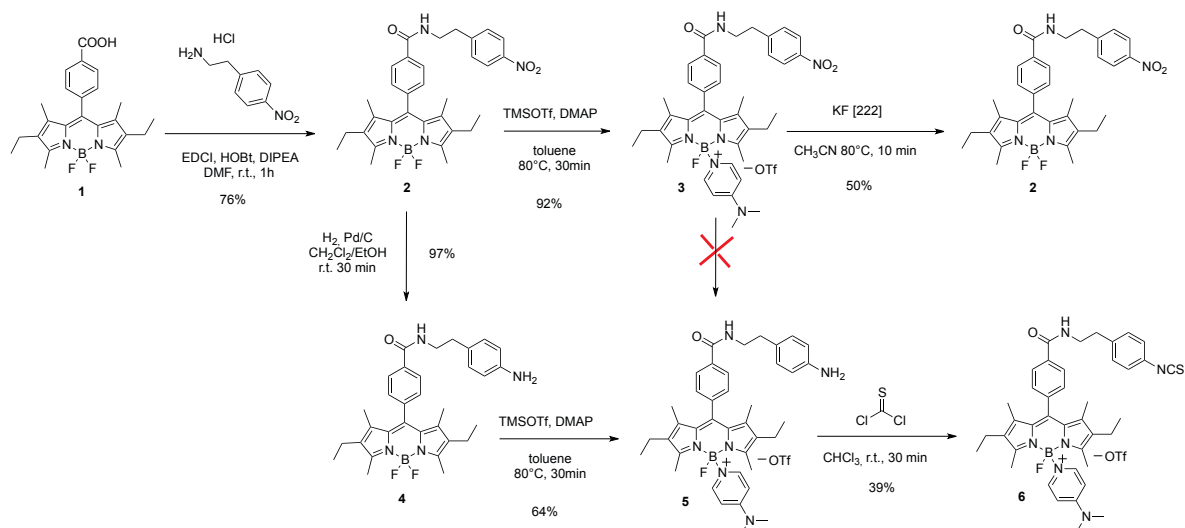


Figure 1 : Synthesis of [^{18}F]-BODIPY through DMAP-activated BODIPY.

We report the synthesis and characterization of various DMAP-BODIPY precursors bearing activated functional groups for bioconjugation along with their photophysical properties. The chemical stability of the DMAP moiety is described. These DMAP-BODIPY assemblies have been attached to the bombesin peptide and *in vitro* tests towards the bombesin receptors are presented. Finally, NIR BODIPY compounds have been prepared in order to shift both the absorption and emission bands towards the near IR region for *in vivo* imaging.

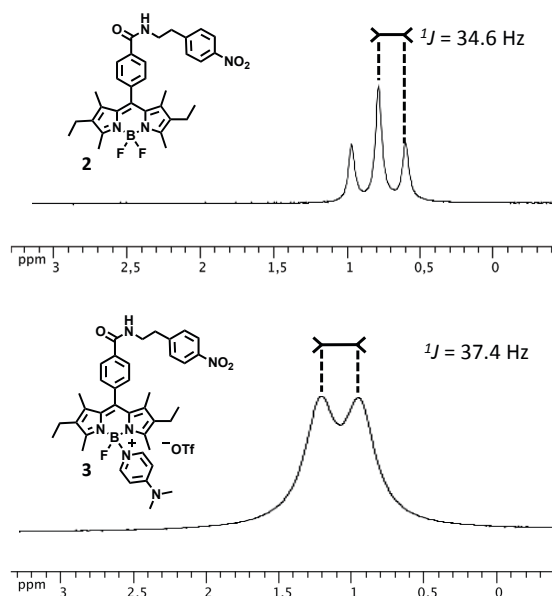
Results and Discussion

The bifunctional target agent 6 was first prepared. This molecule bears a DMAP ligand on the boron atom as a leaving group, which was previously validated as an adequate strategy for the incorporation of ^{18}F .^[15] The compound is further activated using an isothiocyanate functional group for its conjugation with amines. Target 6 was obtained in four steps starting from the known precursor 1.^[20] A nitrophenyl function was introduced by peptidic coupling between 1 and 2-(4-nitrophenyl)ethanamine in order to obtain 2 in 76% yield. The nitro group was reduced into amine function to yield 4 in almost quantitative yield.^[17b] The next step consisted in the introduction of DMAP by first replacing one of the fluorine atoms by the leaving group TMSOTf and then adding DMAP *in situ*. Finally, the activation of the amine into an isothiocyanate was performed thus giving access to the desired compound 6. Noteworthy, the introduction of the DMAP (i.e. formation of 3) followed by the reduction of nitro into amine, as an alternative synthetic approach, was not successful because of the undesired elimination of the DMAP group during the hydrogenation process.

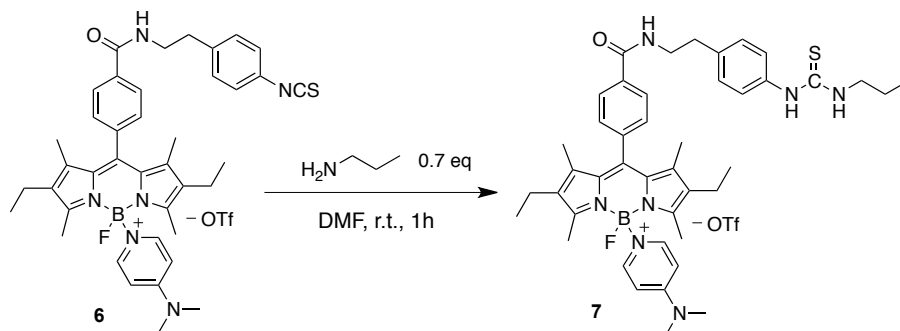


Scheme 1 : Synthesis of compound 6.

The feasibility of a subsequent radiofluorination on the DMAP prosthetic compound was successfully verified by reaction of **3** with KF in the presence of the commonly used kryptofix® 222.^[21] Compound **2** could then be obtained from **3** in 10 min, in 50% yield. The fluorination product can easily be monitored and characterized by mass spectrometry and ^{11}B NMR spectroscopy. The ^{11}B NMR spectrum of the DMAP-BODIPY product exhibits the expected doublet while the BF_2 -BODIPY compound exhibits the typical triplet characteristic of the ^{11}B - ^{19}F couplings ($I = \frac{1}{2}$). A typical example is shown in Figure 2.

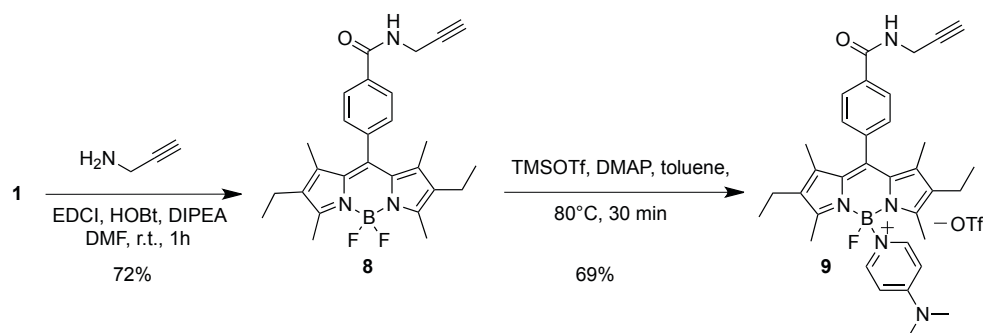
Figure 2: Comparison of the ^{11}B NMR spectra of compounds **2** and **3** (192.5 MHz, CDCl_3).

The bioconjugation step feasibility was evaluated by reacting the activated DMAP-BODIPY **6** with 0.7 equivalent of propylamine (Scheme 2). However, the purification step was very complicated and resulted in some degradation of the desired compound, which may be a problem for the bioconjugation. Bearing in mind the aim for the design of systems allowing for the introduction of ^{18}F after the bioconjugation step, the substitution of the amine by another activated function was investigated.



Scheme 2: Coupling test of **6** with propylamine.

The click chemistry provides a number of avenues for the design of complex structures and multi component functionalized systems.^[22] In particular, copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition has already become a powerful technique in peptide science due to its simplicity and bioorthogonality. It has been utilized in the cyclization of peptides, ligation of two or more peptide fragments and conjugation to biomolecules, nanoparticles, polymers and other chemical entities.^[23] The impact of the click chemistry on conjugation methods, especially bioconjugation, has been extensive in recent years. This approach is very appealing because it allows one to selectively attach a bimodal agent to a modified bombesin peptide while avoiding the lysine functions on the biomolecule. Compound **9** was synthesized in two steps, starting from **1**: first the introduction of a triple bond on the BODIPY using a peptidic coupling with prop-2-yne-1-amine, followed by the incorporation of the DMAP ligand (Scheme 3).

Scheme 3: Synthesis pathway of **9**.

Single crystals suitable for X-ray diffraction analysis of **8** were obtained from a mixture of DCM/hexane (Figure 3). The boron atom exhibits the typical tetrahedral geometry and the boron-dipyrromethene is nearly perpendicular to the phenyl group at the meso-position exhibiting a dihedral angle of $79.269(45)^\circ$. This angle and the crystal packing are imposed by hydrogen bonding between $N1-H1 \dots O1 = 2.868(2) \text{ \AA}/169(2)^\circ$ (see ESI). The C26-C27 distance of $1.183(3) \text{ \AA}$ confirms the presence of the alkyne triple bond.

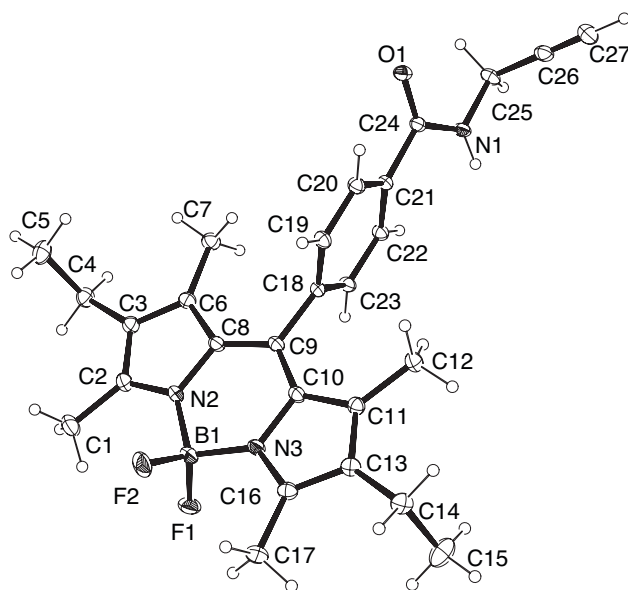
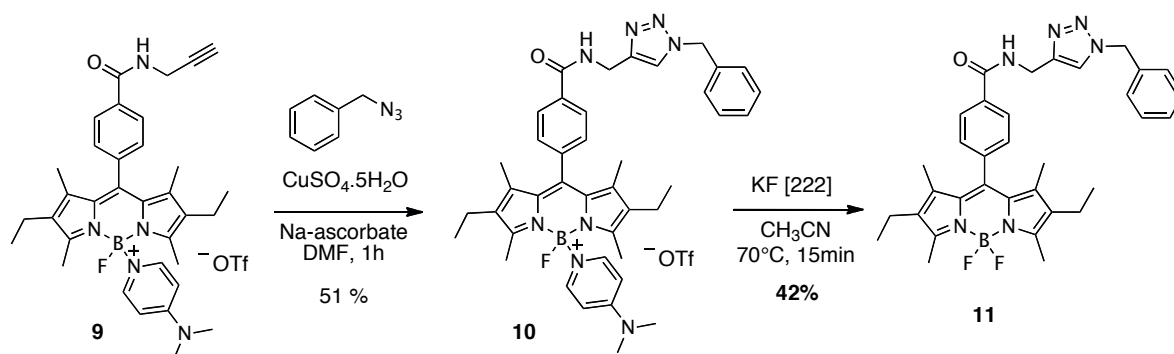


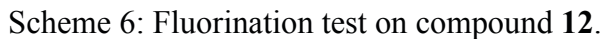
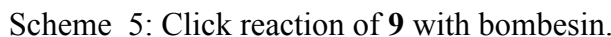
Figure 3: ORTEP^[24] view of **8**. The thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability level. Selected bond lengths (\AA) and angles ($^\circ$): B1-F1 = $1.391(2)$, B1-F2 = $1.383(2)$, B1-N2 = $1.549(3)$, B1-N3 = $1.551(3)$, F1-B1-N2 = $109.58(16)$, F1-B1-N3 = $109.87(16)$, F2-B1-F1 = $109.96(16)$, F2-B1-N2 = $110.00(16)$, F2-B1-N3 = $110.29(17)$, N2-B1-N3 = $107.10(14)$.

Some click reaction tests were performed using **9**. The coupling reaction was successful when the click conditions precluded any amine, such as diisopropylethylamine, as base. Compound **10** was then obtained by reacting **9** with one equivalent of azidomethylbenzene using CuSO_4 as catalyst and sodium ascorbate (Scheme 4). Noteworthy, the DMAP group desirably remained anchored on the BODIPY in these conditions. Substitution of the DMAP with one equivalent of F^- and in the presence of kryptofix[®] [222] could then be performed on **10**, yielding **11** in 42% yield.



Scheme 4: Synthesis and fluorination of compound **10**.

A click reaction was also performed on a bombesin derivative, N_3 -AEEAc-bombesin(7-14) (**N₃-BBN**). Bombesin is a 14-mer peptide that binds to three G-protein coupled receptors (GRP-R, NMB-R and BRS-3) overexpressed in a wide variety of tumour tissues. Bombesin and its analogues have been extensively studied as targeting agents for the detection of cancer in pre-clinical and clinical studies using numerous imaging modalities.^[25] Here, the widely used 8-mer peptide bombesin(7-14) was chosen as model, which contains the minimal sequence required for high affinity binding to its receptors. The peptide was acylated on its N-terminal with a *N*-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy))acetyl chain in order to introduce the azide function and to provide flexibility and water solubility to the conjugate. The coupling reaction was monitored by HPLC and provided **12** in 59% yield.



BODIPY signature, which consists of the S_0-S_1 feature placed near 520 nm, and the S_0-S_2 one located near 380 nm. Both bands are readily assigned to spin-allowed $\pi-\pi^*$ transitions. The emission bands are observed at ~ 540 nm and exhibit a mirror-image relationship with the absorption, indicating that the structural perturbation in the excited state is minimal. This observation is corroborated by the fact that the excitation spectra superpose well the absorption ones. The absorption features located in the 200-300 nm range are due to the absorption of tryptophan side chain of the bombesin. Interestingly, the DMAP loss going from **12** to **13** is accompanied by the disappearance of its characteristic absorption band at 279 nm.

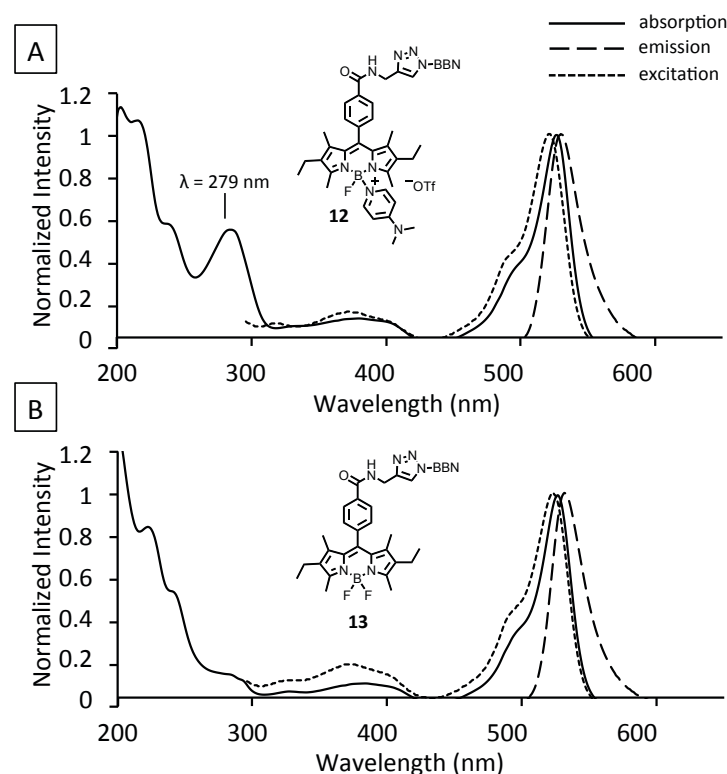


Figure 4: Absorption, emission ($\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation ($\lambda_{\text{ex}} = 590$ nm) spectra of **12** and **13** in 2-MeTHF.

Biological testing. The affinity of the bioconjugate **13** for bombesin receptors (on rat cerebral cortex membranes) was evaluated on a radioactive binding assay using [^{125}I]-[Tyr⁴]bombesin(1-14) as ligand.^[26] Under these assay conditions, **13** was able to compete with the binding of the radioligand with a K_i of 0.33 nM while the unlabelled peptide **N₃-BBN** exhibited a K_i of 0.36 nM (Figure 5). This result illustrates that, despite its size, conjugation of the BODIPY does not modify significantly the binding affinity of a small peptide such as BBN(7-14) for its receptor.

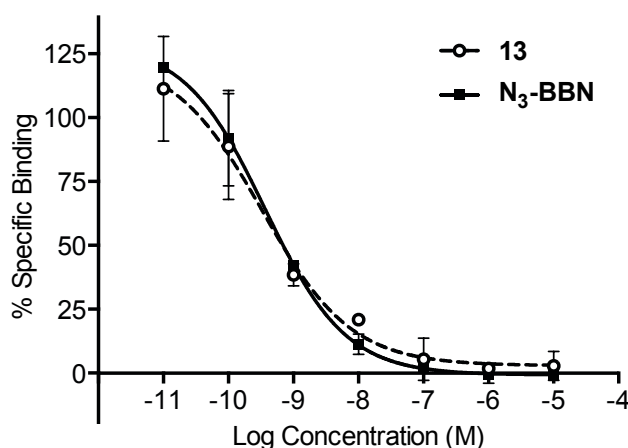
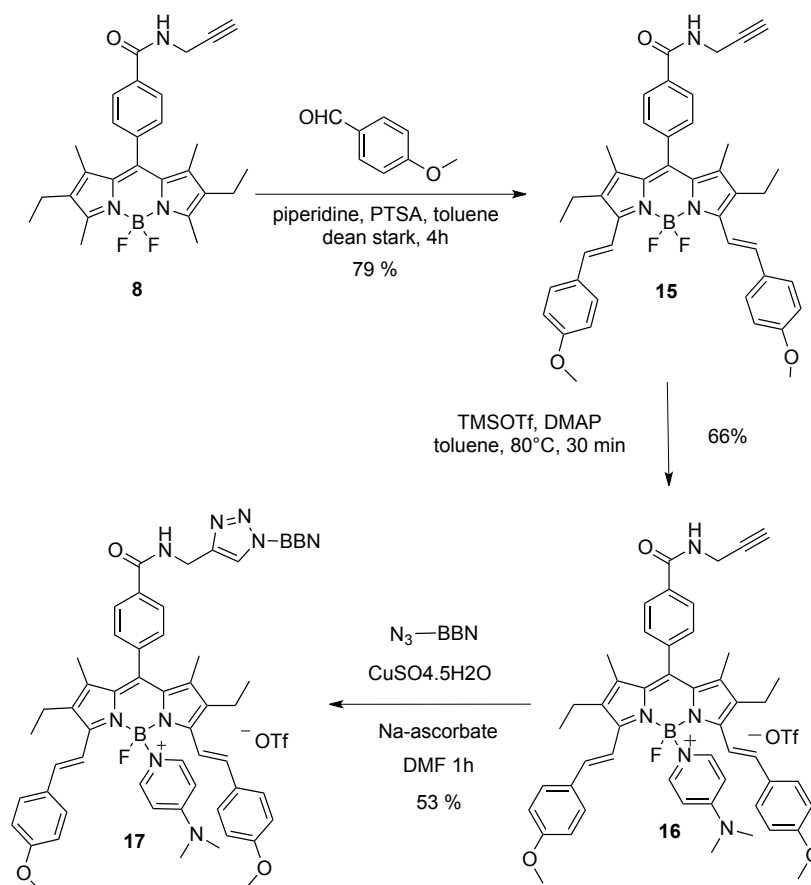
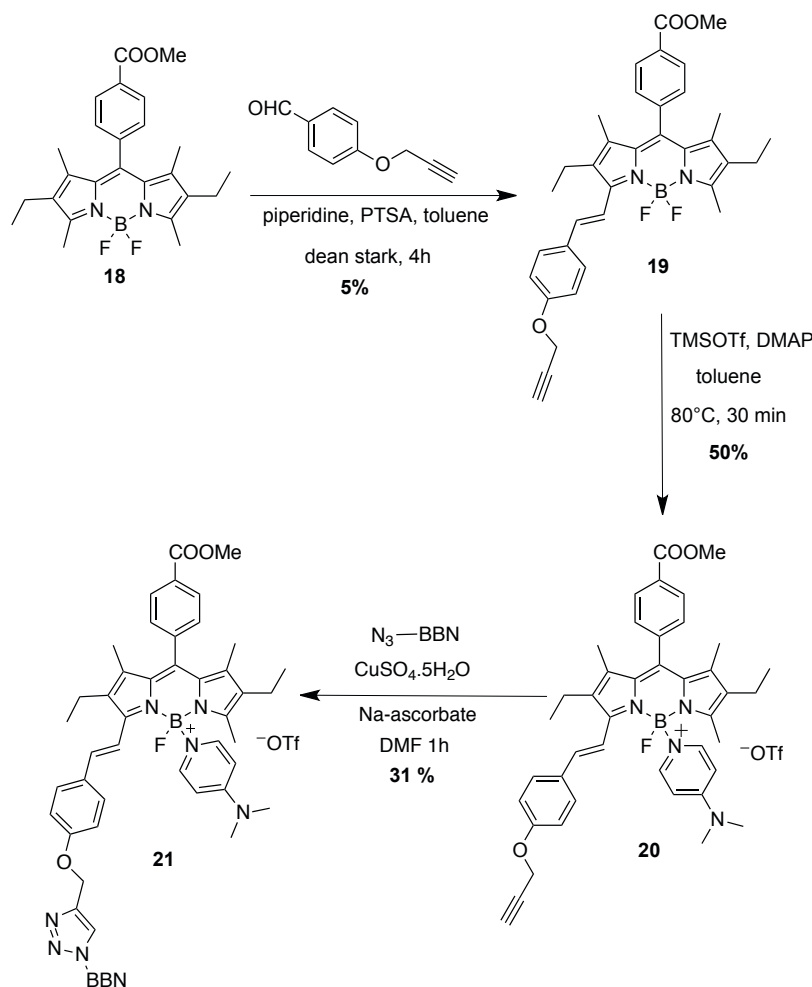


Figure 5. Displacement of radioligand [^{125}I]-[Tyr 4]bombesin(1-14) binding at rat cerebral cortex membranes by **13** and **N₃-BBN**. Non-specific binding was defined by 1 μM cold bombesin(1-14).

Towards the red and NIR regions for *in vivo* imaging. Dyes active in the near infrared region (NIR) are more adapted for *in vivo* applications, such as molecular imaging. Advantages include minimal interfering absorption and fluorescence from biological samples, reduced scattering and enhanced tissue penetration depth. One simple way to extend the π -conjugation and to shift the absorption and emission bands to the NIR region is to perform a Knoevenagel condensation on the methyl groups at the α -pyrrolic positions.^[27] Indeed, the target distyryl compound **15** was prepared in 79% yield by reacting **8** with four equivalents of 4-methoxybenzaldehyde, in the presence of piperidine and PTSA (*p*-toluenesulfonic acid) (Scheme 7). The DMAP was then introduced onto **15** and the resulting activated precursor **16** was subsequently attached to the bombesin peptide in 53% yield.

Scheme 7: Synthetic pathway of **17**.

The formation of the monostyryl derivative can also be interesting because of their high quantum yield of fluorescence.^[28] Thus, the monofunctionalized compound **19** was synthesized by reacting **18** with 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (Scheme 8). The low reaction yield is explained by the difficulty to control the mono- versus di-condensation and problems with the purification. As previously shown for other derivatives, the DMAP could be anchored and the resulting assembly **20** was attached to the bombesin peptide in 31% yield.

Scheme 8: Synthesis pathway of **21**.

The ^1H NMR spectrum of compound **20** is shown in Figure 6. Each substituent in the α - and β -pyrrolic positions displays one signal. The substituents located on the side of the styryl group are the most deshielded. For instance, the two methyls in β -pyrrolic positions display two singlets at 1.34 and 1.36 ppm. The tetrahedral geometry of the boron atom induces that DMAP ligand is orthogonal to the indacene plane. Consequently, the two faces of the indacene are dissymmetric and the boron atom in BODIPY **20** is a chiral centre. Therefore, protons carried by the CH_2 groups in β -pyrrolic positions are diastereotopic. Notably, protons 7 and 7' which are of the side of the styryl group displays each a quartet ($^3J = 7.3$ Hz) at 2.43 and 2.45 ppm, split by a geminate coupling 1J of 12.2 Hz. Additionally, as the methyl in β -pyrrolic position impedes the rotation of the aromatic ring at the *meso*-position, the four protons of the aromatic ring display four signals whereas they display two doublets for a symmetrical BF_2 -BODIPY. Each proton displays a doublet of doublets ($^3J = 7.9$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz).

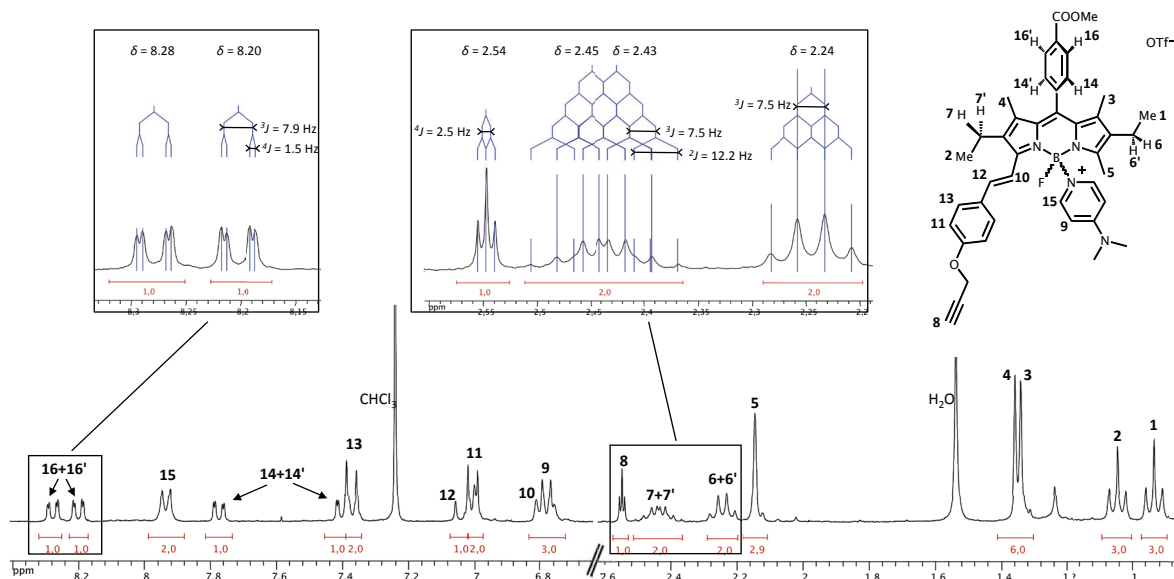


Figure 6: ^1H NMR spectrum and assignments of **20** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K).

Photophysical Studies. Table 1 summarizes the absorption and steady-state fluorescence data of the different BODIPY-containing compounds. Noteworthy, the photophysical data of **12**, **13** and **21** were measured using DMSO/PBS 1:1 as a solvent mixture due to lack of solubility in PBS (phosphate buffered saline). The emission lifetimes, τ_F ($3.9 < \tau_F < 6.9$ ns), and the small Stokes shifts, $\Delta\nu$, confirm the presence of fluorescence. The fluorescence quantum yields, Φ_F , vary from 35 to 87% and are considered large enough for imaging applications.

Generally, the introduction of DMAP group onto the BODIPY chromophore induces a bathochromic shift of the absorption and emission maxima. Moreover, the Stokes shifts ($\Delta\nu$ in cm^{-1} units; a linear scale of energy) of the DMAP-containing BODIPYs are larger than in their BF_2 analogues. For instance, compounds **15** and **16** display fluorescence maxima respectively at 681 and 703 nm with Stokes shifts of 610 and 950 cm^{-1} . The introduction of styryl substituents induces a bathochromic shift of the absorption and fluorescence bands respectively by ~ 60 and 130 nm for the mono- and distyryl-BODIPYs derivatives, and does not affect their fluorescence quantum yields. Finally, compounds **12**, **13** and **21** display high fluorescence quantum yields ($0.35 < \Phi_F < 0.40$), which confirm that the introduction of bombesin on dyes **8**, **9** and **20** does not affect the intense luminescence properties of BODIPYs.

Table 1: Photophysical properties of selected BODIPY derivatives.

Dye	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	Φ_{F}	τ_{F} (ns)	solvent
2	526	540	490	0.59 ^a	3.9	2-MeTHF
3	527	544	590	0.54 ^a	6.2	2-MeTHF
6	528	544	560	0.37 ^a	5.6	2-MeTHF
8	525	543	630	0.59 ^a	4.6	2-MeTHF
9	528	543	520	0.64 ^a	6.9	2-MeTHF
12	525	542	600	0.35 ^a	-	DMSO/PBS 1:1
13	527	542	530	0.40 ^a	-	DMSO/PBS 1:1
15	654	681	610	0.42 ^b	6.3	2-MeTHF
16	659	703	950	0.51 ^b	4.7	2-MeTHF
17	654	-	-	-	-	CH ₃ CN
19	587	603	450	0.76 ^c	5.4	2-MeTHF
20	594	617	630	0.87 ^c	4.7	2-MeTHF
21	592	615	630	0.51 ^c	-	DMSO/PBS 1:1

Stokes shift, $\Delta\nu$, were calculated using the equation $1/\lambda_{\text{abs}} - 1/\lambda_{\text{ex}}$. The quantum yields, Φ_{F} , were measured at 298 K, using rhodamine 6G^a ($\Phi_{\text{F}} = 0.94$ in methanol), rhodamine 101^b ($\Phi_{\text{F}} = 1.00$ in methanol) and cresyl violet^c ($\Phi_{\text{F}} = 0.54$ in methanol) as references. ^[29]

Conclusion

Several new potential bimodal agents for PET-optical imaging have been synthesized and characterized. The photophysical study demonstrated that these BODIPY-containing systems exhibit high fluorescence quantum yields. Bioconjugation on the bombesin peptide and competitive binding essay on BF₂-BODIPY-BBN were performed evidencing that the presence of the bimodal agent did not affect the affinity of the peptide for the receptors. Thus, the use of [¹⁸F]-BODIPY, instead of bulky multimodal chelation platform approach, could be a relevant alternative for the labelling of small biovector such as peptides. Additionally, the fluorination of the labelled biovectors was investigated, which showed the possibility of introducing ¹⁸F. Finally, several red and NIR analogues were synthesized, showing the high potential of these systems for future *in vivo* imaging, even though some issues concerning the hydrosolubility will have to be addressed.

Experimental Section

Materials. Unless otherwise noted, all chemicals and solvents were of analytical reagent grade and were used as received. Absolute dichloromethane (CH₂Cl₂) was obtained from Carlo Erba. Silica gel (Merck; 70-120 mm) was used for column chromatography.

Analytical thin-layer chromatography was performed with Merck 60 F254 silica gel (precoated sheets, 0.2 mm thick). Reactions were monitored by thin-layer chromatography, RP-HPLC, UV/Vis spectroscopy and MALDI/TOF mass spectrometry.

Instrumentation. The ^1H , ^{11}B and ^{13}C NMR spectra were recorded at room temperature on a Bruker Avance II 300 (300 MHz) or on a Bruker Avance DRX 600 (600 MHz) spectrometer at the “Welience, Pôle Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (WPCM)”. Chemical shifts (^1H NMR spectra) are expressed in ppm relative to chloroform (7.26 ppm). The UV–visible spectra were recorded on a Varian Cary 1 spectrophotometer. The mass spectra and accurate mass measurements (HR-MS) were obtained on a Bruker Daltonics Ultraflex II spectrometer in the MALDI/TOF reflectron mode using dithranol as a matrix or on a LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) instrument in ESI mode. Both measurements were registered at the “Welience, Pôle Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (WPCM)”. The steady-state fluorescence emission and excitation spectra were obtained on a Fluorolog SPEX 1680 0.22 m double monochromator spectrometer using quartz cuvettes (1 cm, 3 mL). All fluorescence spectra were corrected for apparatus response. The fluorescence lifetimes were measured in 2-MeTHF or DMSO/PBS 1:1 using a Timemaster Model TM-3/2003 apparatus from PTI incorporating a nitrogen laser as the source and a high-resolution dye laser (fwhm = 1.4 ns). Fluorescence lifetimes were obtained from high-quality decays and deconvolution or distribution lifetime analysis. The uncertainties were 100 ps on the basis of multiple measurements, which is also the limit of accuracy of this system.

X-ray crystallography. Single crystals of $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$ (**8**) were recrystallized from a mixture of DCM and hexane by slow evaporation. A suitable crystal was selected and mounted on a glass fibre with grease on a Nonius Kappa APEX2 diffractometer. Data integration and reduction were performed using DENZO.^[30] The crystal was kept at 115(2) K during data collection. Using Olex2,^[31] the structure was solved with the ShelXS^[32] structure solution program using Direct Methods and refined with the ShelXL^[32] refinement package using Least Squares minimisation. CCDC 984188 contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif

Crystal Data for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}$ ($M = 461.35$): monoclinic, space group $\text{P}2_1/\text{c}$ (no. 14), $a = 22.5475(5) \text{ \AA}$, $b = 12.4861(2) \text{ \AA}$, $c = 8.6671(2) \text{ \AA}$, $\beta = 90.9550(10)^\circ$, $V = 2439.71(9) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $T = 115.0 \text{ K}$, $\mu(\text{Mo-K}\alpha) = 0.087 \text{ mm}^{-1}$, $D_{\text{calc}} = 1.256 \text{ g/mm}^3$, 10013 reflections measured ($5.722 \leq 2\theta \leq 55.03$), 5560 unique ($R_{\text{int}} = 0.0249$, $R_{\text{sigma}} = 0.0309$) which were used in all calculations. The final R_1 was 0.0529 ($I > 2\sigma(I)$) and wR_2 was 0.1238 (all data).

Binding assays. Compounds **13** and **N₃-BBN** were tested by Cerep (Poitiers, France) on a radioactive binding assay. Briefly, rat cerebral cortex membr-ab-nes were incubated in the

presence of 0.01 nM [^{125}I]-[Tyr⁴]bombesin ligand ($K_D = 0.71$ nM) and a range of concentrations of tested compounds for 60 min at room temperature. Non-specific binding was determined in presence of an excess (1 μM) of cold bombesin(1-14). The results are expressed as a percent of control specific binding. The IC_{50} values (concentration causing a half-maximal inhibition of control specific binding) were determined by non-linear regression analysis of the competition curves generated with duplicate values using GraphPad Prism version 6.00 for Mac. The corresponding inhibition constants (K_i) were calculated using the Cheng-Prusoff equation.^[33] Bombesin(1-14) was used as a reference compound ($K_i = 0.17$ nM). Further details of the methodology for the assay can be found at <http://www.cerep.fr>.

Quantum Yield Measurements. Measurements were performed in distilled 2-MeTHF or in DMSO/PBS 1:1. Quartz cuvettes of 3 mL with path length of 1 cm equipped with a septum were used, and all solutions were Ar-degassed prior to measurements. Three different measurements (i.e., different solutions) were performed for each quantum yield. The sample concentrations were chosen to obtain an absorbance of about 0.05. The fluorescence quantum yield (Φ_F) measurements were performed with the slit width of 0.5-1.5 nm for both excitation and emission. Relative quantum efficiencies were obtained by comparing the areas under the corrected emission spectra of the sample relative to a known standard and the following equation was used to calculate Φ_F : $\Phi_F(\text{sample}) = \Phi_F(\text{standard}) \cdot (I(\text{sample})/I(\text{standard})) \cdot (A(\text{standard})/A(\text{sample})) \cdot (\eta(\text{sample})^2/\eta(\text{standard})^2)$ where $\Phi_F(\text{standard})$ is the reported quantum yield of the standard, I is the integrated emission spectrum, A is the absorbance at the excitation wavelength and η is the refractive index of the solvents used. Rhodamine 6G ($\Phi_F = 0.94$ in methanol),^[29a] Cresyl Violet ($\Phi_F = 0.54$ in methanol),^[29c] and Rhodamine 101 ($\Phi_F = 1.00$ in methanol)^[34] were used as standards.^[35] In all Φ_F determinations, correction for the solvent refractive index (η) was applied (2-MeTHF: $\eta = 1.406$, DMSO/PBS 1:1: $\eta = 1.416$ methanol: $\eta = 1.328$).^[36]

BODIPY-peptides purification and analysis. The crude products were purified by semi-preparative RP-HPLC on a Dionex Ultimate 3000 system (Thermo Scientific) equipped with a Nucleodur C18ec column (Macherey-Nagel, 250 \times 10 mm, 5 μm) with a gradient program (solvent A is water with 0.1% TFA and solvent B is acetonitrile with 0.1% TFA) at a flow rate of 2 mL/min with UV detection at 254, 530, 590 and 650 nm. Fractions were analysed by RP-HPLC on a Dionex Ultimate 3000 system, with a photodiode array detector, on a Chromolith HighResolution C18ec column (Merck, 50 \times 4.6 mm), equipped with a guard column (5 \times 4.6 mm), at a flow rate of 3 mL/min and the pure fractions were collected and lyophilized to yield the final compounds as highly purified (>95%) white, red, purple or blue solids. The purity of the compounds was determined by RP-HPLC at 254 nm. The identity of the compounds was checked by low-resolution electrospray mass spectrometry (ESI-MS; Bruker) or by high-resolution electrospray mass spectrometry (HRMS; Orbitrap, Thermo Scientific).

N₃-BBN. The peptide (*N*-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy))acetyl-bombesin(7-14)) was obtained by manual solid-phase peptide synthesis (0.48 mmol scale) on a Rink Amide AM resin (Iris Biotech, 0.48 mmol/g). All amino acids, from Iris Biotech or Novabiochem, were *N*- α -terminal protected by Fmoc. 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy))acetic acid was synthesized according to the literature.^[37] Briefly, the resin (1.0 g) was swelled in DMF for 30 min and Fmoc was removed by treating the resin twice with 20% piperidine, 0.1 M HOBt in DMF (10 mL) for 10 min. After the second treatment, the resin was washed with DMF (3 \times 10 mL) and DCM (3 \times 10 mL). Coupling reactions were performed by adding to the resin a pre-made coupling cocktail of DIPEA (3 eq.), HBTU (3 eq.) and the required amino acid or 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy))acetic acid (3 eq.) in DMF (10 mL). The suspension was left shaking for 1 h, drained and washed with DMF (3 \times 10 mL) and DCM (3 \times 10 mL). The final peptide was cleaved from the resin (200 mg) with simultaneous removal of the side-chain protecting groups by treatment with TFA/TIS/DODT/water (94/2.5/2.5/1 v/v; 5 mL) at room temperature for 1.5 h. The filtrate from the cleavage mixture was concentrated, precipitated in cold Et₂O and collected by centrifugation (twice), and lyophilized to afford crude peptide. The product was purified by semi-preparative RP-HPLC from 20% to 50% of B over 30 min to give **N₃-BBN** as a white solid (TFA salt, m = 25 mg, yield = 36 %, purity > 97%, *t_R* = 2.33 min). ESI-MS: *m/z* = 1111.6 [M+H]⁺, 1133.55 [M+Na]⁺. HRMS (ESI) 1111.54399, calculated for C₄₉H₇₅N₁₆O₁₂S⁺ 1111.54656.

Compound 1. 2,4-Dimethylethylpyrrole (10.3 g, 83.9 mmol) and 4-carboxy-benzaldehyde (6.30 g, 42.0 mmol) were dissolved in dichloromethane (2.60 mL). Trifluoroacetic acid (328 μ L) was added and the mixture was stirred at room temperature for 48 h. A solution of DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone) (9.53 g, 42.0 mmol) in dichloromethane was added and the mixture was stirred for 50 min. Triethylamine (84.0 mL, 630 mmol) and BF₃·Et₂O (85.0 mL, 672 mmol) were added and the solution turned purple. After 2 h of stirring, the reaction mixture was washed with water, dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (AcOEt/hexane 90:10). Recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane gave **1** as a red solid (m = 8.40 g, yield = 47 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.92 (t, 6H, ³*J* = 7.5 Hz), 1.21 (s, 6H), 2.24 (q, ³*J* = 7.5 Hz, 4H), 2.47 (s, 6H), 7.39 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H), 8.18 (d, ³*J* = 8.4 Hz, 2H).

Compound 2. N-Hydroxybenzotriazole (640 mg, 4.70 mmol), diisopropylamine (1.15 mL, 7.10 mmol), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (900 mg, 4.70 mmol) and 4-nitrophenethylamine hydrochloride (0.49 g, 2.40 mmol) were added dropwise to a solution of **1** (1.00 g, 2.40 mmol) in 50 mL of dimethylformamide and the solution was stirred at room temperature. After total consumption of the starting material (2 h) monitored by TLC, the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (2*100 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated to give a red oil. The

crude product was purified by column chromatography on silica gel (ethyl acetate/hexane 60:40) followed by recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give pure **2** as a reddish solid (1.21 g, 76% yield). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.95 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.22 (s, 6H), 2.27 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 2.51 (s, 6H), 3.10 (t, $^3J_A = 7.1$ Hz, 2H), 3.78 (td, $^3J_A = 7.1$ Hz, $^3J_B = 6.0$ Hz, 2H), 6.27 (t, $^3J_B = 6.0$ Hz, 1H), 7.37 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.43 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 7.83 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 8.19 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H).

Compound 3. 190 μL of trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf, 1.05 mmol) and 128 mg of dimethylaminopyridine (DMAP, 1.05 mmol) were added to a solution of **2** (300 mg, 0.524 mmol) in dry toluene (15 mL), and the mixture was stirred for 30 min at 80°C . The solvent was evaporated; the residue was washed with water (3*20 mL) and dried over magnesium sulfate. The solution was concentrated to dryness and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 97:3) to give **3** as a red solid (m = 397 mg, yield = 92 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.91 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.30 (s, 6H), 2.13 (s, 6H), 2.20 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.13 (t, $^3J_A = 7.5$ Hz, 2H), 3.21 (s, 6H), 3.78 (td, $^3J_A = 7.5$ Hz, $^3J_B = 5.9$ Hz, 2H), 6.86 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H), 7.34 (dd, $^3J_C = 8.0$ Hz, $^4J_D = 1.8$ Hz, 1H), 7.47 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 7.55 (dd, $^3J_C = 8.0$ Hz, $^4J_D = 1.8$ Hz, 1H), 7.71 (t, $^3J_B = 5.9$ Hz, 1H), 7.98 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H), 8.11 (dd, $^3J_C = 8.0$ Hz, $^4J_D = 1.8$ Hz, 1H), 8.12 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 8.13 (dd, $^3J_C = 8.0$ Hz, $^4J_D = 1.8$ Hz, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 12.2 (*2), 12.5 (*2), 14.0 (*2), 17.0 (*2), 29.7 (*2), 35.6, 40.1, 107.6-123.7-128.0-128.3-128.5-128.9-129.9-130.9-134.8-135.4-137.1-141.0-141.7-142.0-146.7-147.5-154.0-156.2 (*28), 166.7. ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3) δ 1.08 (d, $^1J = 37.4$ Hz). ESI-MS: $m/z = 553.3$ [$\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{-OTf}$] $^+$, 675.3 [$\text{M}-\text{OTf}$] $^+$. HRMS (ESI) 675.36018, calculated for $\text{C}_{39}\text{H}_{45}\text{BF}_6\text{N}_6\text{O}_3^+$ 675.36315. UV-Vis (THF) λ nm ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 527 (62), 498 (21), 377 (8), 285 (33), 242 (35).

Fluorination of compound 3: 23.0 mg of 13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-(8,8,8)-hexacosane (61.0 μmol), and 4.00 mg of potassium fluoride (69.0 μmol) were added to a solution of 50 mg of **3** (61 μmol) in 2.5 mL of acetonitrile. The solution was heated to 70°C and the reaction was monitored by TLC. After 10 min, the solvent was removed under reduced pressure. 5 mL of water was added and the mixture was extracted with 3*5 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (dichloromethane/hexane 70:30) followed by recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give pure **2** as a red solid (m = 17.0 mg, yield = 50 %).

Compound 4. Compound **2** (300 mg, 524 μmol) was placed in 45 mL of a mixture of dichloromethane and ethanol (1:1), and 5.00 mg of 10 % Pd/C (24.0 μmol) was added under H_2 . After total consumption of the starting material (1 h) followed by TLC, the

suspension was eliminated by filtration on Clarcel® and the solvent was evaporated. The crude product was recrystallized in a mixture of dichloromethane and hexane to give **4** as a red solid (m = 277 mg, yield = 97 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 0.94 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H), 1.21 (s, 6H), 2.26 (q, ³J = 7.5 Hz, 4H), 2.50 (s, 6H), 2.83 (t, ³J_A = 7.1 Hz, 2H), 3.69 (td, ³J_A = 7.1 Hz, ³J_B = 6.0 Hz, 2H), 6.36 (t, ³J_B = 6.0 Hz, 1H), 6.65 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.02 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.31 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.81 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H). ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 12.1 (*2), 12.8 (*2), 14.8 (*2), 17.3 (*2), 35.0, 41.7, 115.7 (*2), 127.8 (*2), 128.7 (*2), 129.0 (*2), 129.9, 130.6, 133.3, 135.2 (*2), 138.4 (*2), 139.0, 139.4 (*2), 145.2, 154.4 (*2), 166.8. ¹¹B NMR (192.5 MHz, CDCl₃): δ 0.79 (t, ¹J = 33.4 Hz). ESI-MS: m/z = 523.3 [M-F]⁺, 545.3 [M-H-F+Na]⁺, 565.3 [M+Na]⁺. HRMS (ESI) 565.28996, calculated for C₃₂H₃₇BF₂N₄ONa⁺ 565.29263.

Compound 5. 75.0 μL of trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf, 412 μmol) and 128 mg of dimethylaminopyridine (DMAP, 412 μmol) were added to a solution of **4** (112 mg, 206 μmol) in dry toluene (7 mL), and the mixture was stirred for 30 min at 80°C. The solvent was evaporated, the residue was washed with water (3*20 mL) and dried over magnesium sulfate. The solution was concentrated to dryness and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 99:1) to give **5** as a red solid (m = 105 mg, yield = 64 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.91 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H), 1.31 (s, 6H), 2.13 (s, 6H), 2.20 (q, ³J = 7.5 Hz, 4H), 3.13 (t, ³J_A = 7.0 Hz, 2H), 3.21 (s, 6H), 3.68 (td, ³J_A = 7.0 Hz, ³J_B = 5.7 Hz, 2H), 6.52 (t, ³J_B = 5.7 Hz, 1H), 6.68 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 6.93 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H), 7.05 (d, ³J = 8.3 Hz, 2H), 7.34 (dd, ³J_C = 8.0 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H), 7.68 (dd, ³J_C = 8.0 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H), 7.84 (dd, ³J_C = 8.0 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H), 8.00 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H), 8.01 (dd, ³J_C = 8.0 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H). ¹¹B NMR (192.5 MHz, CDCl₃) δ 1.04 (d, ¹J = 41.9 Hz). ESI-MS: m/z = 523.3 [M-C₇H₁₀N₂-OTf]⁺, 645.4 [M-OTf]⁺. HRMS (ESI) 645.38897, calculated for C₃₉H₄₇BFN₆O⁺ 645.38897.

Compound 6. Compound **5** (105 mg, 163 μmol) was placed in a solution of 15 mL of chloroform and 46 μL of triethylamine and 37 μL of thiophosgene were added under nitrogen. The mixture was stirred 1 h at room temperature and the solvent was evaporated. The resulting solid was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 96:4) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give pure **6** (m = 63.0 mg, yield = 39 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.91 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H), 1.32 (s, 6H), 2.13 (s, 6H), 2.21 (q, ³J = 7.5 Hz, 4H), 3.00 (t, ³J_A = 7.4 Hz, 2H), 3.22 (s, 6H), 3.72 (td, ³J_A = 7.4 Hz, ³J_B = 5.7 Hz, 2H), 6.90 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 7.03 (t, ³J_B = 5.7 Hz, 1H), 7.16 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.28 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.35 (dd, ³J_C = 8.1 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H), 7.68 (dd, ³J_C = 8.1 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H), 8.01 (dd, ³J_C = 8.1 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H), 8.03 (d, ³J = 7.7 Hz, 2H), 8.06 (dd, ³J_C = 8.1 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H). ¹¹B NMR (192.5 MHz, CDCl₃) δ 1.07 (d, ¹J = 37.3 Hz). ESI-MS: m/z = 565.35 [M-C₇H₁₀N₂-OTf]⁺, 687.36 [M-

OTf]⁺. HRMS (ESI) 687.34293, calculated for C₄₀H₄₅BFN₆OS⁺ 687.34541. UV-Vis (THF) λ nm ($\epsilon \times 10^{-3}$ L mol⁻¹ cm⁻¹): 528 (65), 498 (22), 380 (9), 285 (41), 274 (35), 243 (36), 224 (47).

Compound 7. 10.0 mg of compound **6** (11.0 μ mol) was dissolved in 600 μ L of DMF and 0.70 μ L of propylamine (9.00 μ mol) was added. The mixture was stirred during one hour at room temperature and solvent was removed under reduced pressure. The resulting solid was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/methanol 97:3) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give pure **7** (m = 2.00 mg, yield = 24 %). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.91 (t, ³J_A = 7.4 Hz, 3H), 0.91 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H), 1.31 (s, 6H), 1.65 (qt, ³J_A = 7.4 Hz, ³J_B = 7.3 Hz, 2H), 2.15 (s, 6H), 2.22 (q, ³J = 7.5 Hz, 4H), 2.96 (t, ³J_C = 6.8 Hz, 2H), 3.21 (s, 6H), 3.57 (t, ³J_B = 7.3 Hz, 2H), 3.72 (td, ³J_C = 6.8 Hz, ³J_D = 5.7 Hz, 2H), 6.84 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H), 7.03 (t, ³J_D = 5.7 Hz, 1H), 7.22 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.34 (dd, ³J_E = 8.1 Hz, ⁴J_F = 1.4 Hz, 1H), 7.39 (d, ³J = 8.2 Hz, 2H), 7.47 (dd, ³J_E = 8.1 Hz, ⁴J_F = 1.4 Hz, 1H), 7.78 (dd, ³J_E = 8.1 Hz, ⁴J_F = 1.4 Hz, 1H), 7.96 (d, ³J = 7.3 Hz, 2H), 8.09 (dd, ³J_E = 8.1 Hz, ⁴J_F = 1.4 Hz, 1H). ¹¹B NMR (192.5 MHz, CDCl₃): δ 1.12 (d, ¹J = 36.2 Hz). ESI-MS: m/z = 624.14 [M-C₇H₁₀N₂-OTf]⁺, 746.22 [M-OTf]⁺.

Compound 8. N-Hydroxybenzotriazole (959 mg, 7.10 mmol), diisopropylamine (995 μ L, 7.10 mmol), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.35 g, 7.10 mmol) and propargylamine (227 μ L, 3.50 mmol) were successively added to a solution of compound **1** (1.53 g, 3.50 mmol) in 100 mL of dimethylformamide and the solution was stirred at room temperature. After total consumption of starting material (2 h) monitored by TLC, the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3x100 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated to give a red oil. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/heptane 60:40) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give **8** as reddish solid in 72% yield (1.15 g, 2.49 mmol). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.96 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H), 1.22 (s, 6H), 2.29 (q, ³J = 7.5 Hz, 4H), 2.30 (t, ⁴J = 2.5 Hz, 1H), 2.51 (s, 6H), 3.78 (dd, ⁴J = 2.5 Hz, ³J = 5.2 Hz, 2H), 6.27 (t, ³J = 5.2 Hz, 1H), 7.38 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 7.91 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H). ¹³C{¹H} NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.9, 12.5, 14.6, 17.1, 30.9, 72.1, 79.3, 127.8, 128.9, 130.4, 133.1, 134.0, 138.1, 138.5, 139.7, 154.3, 166.2. ¹¹B NMR (192.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.78 (t, ¹J = 33.4 Hz). UV-visible (THF) λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3}$ L mol⁻¹ cm⁻¹): 238 (39), 494 (27), 525 (90). MS (ESI) m/z = 460.39 [M+H]⁺, 484.34 [M+Na]⁺. HRMS (ESI) 484.23559 calcd for C₂₇H₃₀BF₂N₃ONa 484.23470.

Compound 9. 86.0 μ L of trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf, 480 μ mol) and 58.0 mg of dimethylaminopyridine (DMAP, 480 μ mol) were added to a solution of **8**

(110 mg, 238 μmol) in dry toluene (10 mL), and the mixture was stirred for 30 min at 80°C. The solvent was evaporated, the residue was washed with water (3*20 mL) and dried over magnesium sulfate. The solution was concentrated to dryness and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 99:1) to give **9** as a red solid (m = 118 mg, yield = 69 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.89 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.30 (s, 6H), 2.20 (s, 6H), 2.12 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 2.22 (t, $^4J_A = 2.5$ Hz, 1H), 3.21 (s, 6H), 4.25 (dd, $^4J_A = 2.5$ Hz, $^3J_B = 5.4$ Hz, 2H), 6.89 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H), 7.36 (dd, $^3J_C = 8.5$ Hz, $^4J_D = 1.8$ Hz, 1H), 7.48 (t, $^3J_B = 5.4$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $^3J_C = 8.5$ Hz, $^4J_D = 1.8$ Hz, 1H), 7.98 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H), 8.11 (dd, $^3J_C = 8.5$ Hz, $^4J_D = 1.8$ Hz, 1H), 8.12 (dd, $^3J_C = 8.5$ Hz, $^4J_D = 1.8$ Hz, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3): 12.4 (*2), 12.8 (*2), 14.5 (*2), 17.1 (*2), 29.9, 40.2 (*2), 71.4, 80.0, 107.8-119.8-122.3-128.4-128.7-128.8-129.0-131.0-134.9-137.8-140.8-141.9-154.4-156.8 (*14), 166.5. ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 1.07 (d, $^1J = 36.1$ Hz). ESI-MS: $m/z = 442.4$ $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2-\text{OTf}]^+$, 564.4 $[\text{M}-\text{OTf}]^+$. HRMS (ESI) 564.32907, calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{BFN}_5\text{O}^+$ 564.33104. UV-Vis (THF) λ nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 528 (68), 498 (23), 381 (8), 287 (26), 244 (33).

Compound 10. Benzyl azide (11.0 μL , 84.0 μmol) and compound **8** (60.0 mg, 84.0 μmol) were solubilized in 1.5 mL of DMF. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (21.0 mg, 84.0 μmol) and sodium ascorbate (33.0 mg, 117 μmol) were added. The mixture was stirred under nitrogen at room temperature for 1 h and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude mixture was dissolved in dichloromethane and filtered on celite. The organic layer was washed with water (3 x 20 mL), dried over magnesium sulfate and the solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (dichloromethane/MeOH 99 : 1) followed by recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give **15** as a red solid (m = 36.0 mg, yield = 51 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.91 (t, 6H, $^3J = 7.5$ Hz), 1.30 (s, 6H), 2.12 (s, 6H), 2.21 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.22 (s, 6H), 4.74 (d, $^3J = 5.2$ Hz, 2H), 5.51 (s, 2H), 6.92 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 7.29 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 1H), 7.32 (m, 5H), 7.34 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.68 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 1H), 8.00 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 8.01 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 1H), 8.03 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 1H). ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 1.05 (d, $^1J = 39.5$ Hz). ESI-MS: $m/z = 575.14$ $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2-\text{OTf}]^+$, 697.22 $[\text{M}-\text{OTf}]^+$. HRMS (ESI) 697.39581, calculated for $\text{C}_{41}\text{H}_{47}\text{ON}_8\text{BF}^+$ 697.39515.

Compound 11. 8.90 mg of 13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-(8,8,8)-hexacosane (23.6 μmol), and 1.40 mg of potassium fluoride (23.6 μmol) were added to a solution of 20.0 mg of **10** (23.6 μmol) in 1.5 mL of acetonitrile. The solution was heated at 70°C, and the reaction was monitored by TLC. After 15 min, the solvent was removed under reduced pressure. 3 mL of water was added and the mixture was extracted with 3*3 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography

(dichloromethane/hexane 80 : 20) followed by recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give pure **11** as a red solid ($m = 6.00$ mg, yield = 42 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.95 (t, 6H, $^3J = 7.5$ Hz), 1.21 (s, 6H), 2.27 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 2.51 (s, 6H), 4.70 (d, $^3J = 5.4$ Hz, 2H), 5.50 (s, 2H), 7.20 (t, $^3J = 5.4$ Hz, 1H), 7.27 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.34 (m, 5H), 7.56 (s, 1H), 7.91 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 11.9, 12.5, 14.6, 17.0, 35.5, 54.3, 77.2, 122.3, 127.8, 128.2, 128.8, 128.9, 129.2, 130.4, 133.0, 134.4, 138.1, 138.7, 139.5, 144.7, 144.8, 154.2, 166.7. ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 0.77 (t, $^1J = 67.0$ Hz). ESI-MS: $m/z = 595.12$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 617.08 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI) 617.29663, calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{BF}_2\text{N}_6\text{ONa}^+$ 617.29881.

Compound 12. 20.6 μL of a 100 mM solution of **N₃-BBN** (DMF, 2.10 μmol), 20.6 μL of a 100 mM solution of compound **8** (DMF, 2.10 μmol), 11.3 μL of a 200 mM solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (DMF, 2.30 μmol) and 1.23 mg of sodium ascorbate (6.20 μmol) were mixed together. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and reaction was monitored by HPLC. Crude product was purified by HPLC from 30 % to 60 % of B over 30 min to give **12** as a red solid ($m = 1.21$ mg, yield = 31 %, purity = 98.6 %, $t_R = 2.89$ min). ESI-MS: m/z 1552.77 $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2-\text{OTf}-\text{TFA}]^+$, 1674.78 $[\text{M}-\text{OTf}-\text{TFA}]^+$. HRMS (ESI) 1674.86882, calculated for $\text{C}_{83}\text{H}_{114}\text{BFN}_{21}\text{O}_{13}\text{S}^+$ 1674.87102.

Fluorination of compound 12. 5.60 μL of a 0.03 M solution of **12** (CH_3CN , 0.17 μmol), 5.60 μL of a 0.03 M solution of 13,16,21,24-hexaoxa-1,10-diazabicyclo-(8,8,8)-hexacosane (CH_3CN , 0.17 μmol), and 0.01 mg of potassium fluoride (0.17 μmol) were mixed together. The solution was heated at 70°C during 40 min and monitored by HPLC. The formation of compound **13** was characterized by ESI-MS and HPLC (Conversion = 38 % after 10 min of reaction).

Compound 13. 14.0 μL of a 100 mM solution of **N₃-BBN** (DMF, 1.40 μmol), 14.0 μL of a 100 mM solution of compound **8** (DMF, 1.40 μmol), 7.7 μL of a 200 mM solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (DMF, 1.54 μmol) and 0.83 mg of sodium ascorbate (4.19 μmol) were mixed together. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and reaction was monitored by HPLC. The crude product was purified by HPLC from 30 % to 60 % of B over 30 min to give **13** as a red solid ($m = 955$ mg, yield = 41 %, purity = 98.4 %, $t_R = 3.23$ min). ESI-MS: m/z 1572.80 $[\text{M}-\text{TFA}+\text{H}]^+$, 1594.77 $[\text{M}-\text{TFA}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI) 1572.9795, calculated for $\text{C}_{76}\text{H}_{105}\text{BF}_2\text{N}_{19}\text{O}_{13}\text{S}^+$ 1572.79211; 1594.77718, calculated for $\text{C}_{76}\text{H}_{104}\text{BF}_2\text{N}_{19}\text{O}_{13}\text{SNa}^+$ 1594.77471.

Compound 15. Compound **8** (500 mg, 1.08 mmol) and *p*-anisaldehyde (316 μL , 2.59 mmol) were dissolved in a mixture of dry toluene (40 mL), *p*-toluenesulfonic acid (PTSA, 40.0 mg, 0.23 mmol) and 4 mL of piperidine. The mixture was refluxed during 2 h in a Dean-Stark apparatus and the solvent was removed *in situ*. 40 mL of dry toluene and 4 mL of piperidine were added, and the mixture was refluxed for another 2 h. After total

consumption of the starting material (monitored by UV-Vis), the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3 x 100 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated to give a blue solid. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (heptane/dichloromethane 80 : 20) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give **15** as a blue solid in 79 % yield (600 mg, 0.86 mmol). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.14 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.28 (s, 6H), 2.32 (t, $^4J = 2.5$ Hz, 1H), 2.58 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.84 (s, 6H), 4.30 (dd, $^4J = 2.5$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, 2H), 6.36 (t, $^3J = 5.2$ Hz, 1H), 6.93 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 4H), 7.20 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 2H), 7.43, (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.56 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 4H), 7.65 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 2H), 7.93 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 11.8, 14.1, 18.4, 55.4, 72.2, 79.3, 114.3, 127.8, 128.9, 129.4, 130.3, 132.5, 133.9, 134.1, 135.8, 136.1, 138.3, 140.1, 150.9, 160.3, 166.3. ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.23 (t, $^1J = 34.2$ Hz). MS (ESI): $m/z = 720.35$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI) 720.32039 calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{42}\text{BF}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ 720.31869. UV-visible (THF): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 250 (21), 334 (31), 368 (68), 608 (37), 654 (93).

Compound 16. 60.0 μL of trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf, 330 μmol) and 4.0 mg of dimethylaminopyridine (DMAP, 330 μmol) were added to a solution of **15** (115 mg, 165 μmol) in dry toluene (10 mL), and the mixture was stirred for 30 min at 80°C . The solvent was evaporated, the residue was washed with water (3*20 mL) and dried over magnesium sulfate. The solution was concentrated to dryness and the residue was purified by silica gel column chromatography (dichloromethane/MeOH 97:3) to give **16** as a red solid ($m = 103$ mg, yield = 66 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 1.06 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.36 (s, 6H), 2.29 (t, $^4J_A = 2.5$ Hz, 1H), 2.46 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.01 (s, 6H), 3.85 (s, 6H), 4.30 (dd, $^4J_A = 2.5$ Hz, $^3J_B = 5.1$ Hz, 2H), 6.66 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 2H), 6.85 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 2H), 6.94 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H), 7.04 (t, $^3J_B = 5.1$ Hz, 1H), 7.05 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 2H), 7.37 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 4H), 7.47 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H), 7.77 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 1H), 7.89 (d, $^3J = 6.4$ Hz, 2H), 8.08 (d, $^3J = 7.0$ Hz, 1H), 8.17 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1H). ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 1.45 (d, $^1J = 35.5$ Hz). ESI-MS: $m/z = 678.4$ $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2-\text{OTf}]^+$, 800.4 $[\text{M}-\text{OTf}]^+$. HRMS (ESI) 800.41267, calculated for $\text{C}_{50}\text{H}_{52}\text{BFN}_5\text{O}_3^+$ 800.41502. UV-Vis (THF) λ nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 659 (59), 440 (14), 376 (39), 292 (33).

Compound 17. 5.20 μL of a 100 mM solution of **N₃-BBN** (DMF, 0.52 μmol), 5.20 μL of a 100 mM solution of compound **16** (DMF, 0.52 μmol), 2.80 μL of a 200 mM solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (DMF, 0.57 μmol) and 0.30 mg of sodium ascorbate (1.51 μmol) were mixed together. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and the reaction was monitored by HPLC. The crude product was purified by HPLC from 40 % to 70 % of B over 30 min to give **17** as a red solid (conversion (HPLC) = 41 %, purity = 98.4 %, $t_R = 3.57$ min). Conversion was determined by relative integration of the chromatogram of

the crude compound, at 254 nm. ESI-MS: m/z 1788.79 $[M-C_7H_{10}N_2-OTf-TFA]^+$, 1910.85 $[M-OTf-TFA]^+$. HRMS (ESI) 1910.96003, calculated for $C_{99}H_{126}BFN_{21}O_{15}S^+$ 1910.95495.

Compound 18.^[38] 2,4-Dimethylethylpyrrole (7.50 g, 60.9 mmol) and methyl 4-formylbenzoate (5.00 g, 30.5 mmol) were dissolved in dichloromethane (2 L). Trifluoroacetic acid (140 μ L) was added and the mixture was stirred at room temperature for 24 h. A solution of 2,3-dichloro-5,6-dicyano-p-benzoquinone (6.90 g, 30.5 mmol) in dichloromethane was added to the mixture and the solution was further stirred for 50 min, triethylamine (60 mL) and $BF_3 \cdot Et_2O$ (60 mL) were added, the reaction mixture turned purple. After stirring during 1 h, the reaction mixture was washed with water, dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated. The residue was purified by silica gel column chromatography (dichloromethane/hexane 40:60) followed by recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give pure **18** as a red solid (m = 6.00 g, yield = 45 %). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 0.90 (t, 3J = 7.6 Hz, 6H), 1.18 (s, 6H), 2.22 (q, 3J = 7.6 Hz, 4H), 2.46 (s, 6H), 3.90 (s, 3H), 7.33 (d, 3J = 8.4 Hz, 2H), 8.10 (d, 3J = 8.4 Hz, 2H).

Compound 19. Compound **18** (1.10 g, 2.51 mmol) and 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (442 mg, 2.76 mmol) were dissolved in a mixture of dry toluene (50 mL), *p*-toluenesulfonic acid (PTSA, 53.0 mg, 0.31 mmol) and piperidine (3.30 mL, 33.0 mmol). The mixture was refluxed during 2 h in a Dean-Stark apparatus and the solvent was removed *in situ*. 50 mL of dry toluene and 3 mL of piperidine were added and the mixture was refluxed for another 2 h. After consumption of approximately a third of starting material (monitored by UV-visible), the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3 x 100 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated to give a blue solid. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/heptane 40:60) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give **19** (73.0 mg, 125 μ mol) in 5% yield. Distyryl-substituted BODIPY was also obtained as subproduct in 3 % yield. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 0.97 (t, 3J = 7.5 Hz, 3H), 1.12 (t, 3J = 7.5 Hz, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 2.29 (q, 3J = 7.5 Hz, 2H), 2.52 (t, 4J = 2.4 Hz, 1H), 2.56 (s, 3H), 2.56 (q, 3J = 7.5 Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 4.71 (d, 4J = 2.4 Hz, 2H), 6.97 (d, 3J = 8.8 Hz, 2H), 7.16 (d, 3J = 16.8 Hz, 1H), 7.41 (d, 3J = 8.3 Hz, 2H), 7.54 (d, 3J = 8.8 Hz, 2H), 7.60 (d, 3J = 16.8 Hz, 1H), 8.16 (d, 3J = 8.3 Hz, 2H). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.8, 12.1, 13.0, 14.3, 14.7, 17.3, 17.5, 18.5, 52.6, 56.1, 75.9, 78.6, 115.4, 118.6, 128.8, 129.1, 130.5, 130.9, 131.3, 131.6, 133.4, 134.0, 135.1, 138.0, 141.1, 150.0, 155.8, 158.2, 166.8. ^{11}B NMR (192.5 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 0.98 (t, 1J = 33.8 Hz). MS (ESI): m/z = 603.4 $[M+Na]^+$. HRMS (ESI) 603.26233 calcd for $C_{35}H_{35}BF_2N_2O_3Na$ 603.26071. UV-visible (THF): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} L mol^{-1} cm^{-1}$) = 238 (19), 319 (17), 339 (29), 389 (8), 448 (27), 587 (81).

Compound 20. 22.0 μL of trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf, 120 μmol) and 15.0 mg of dimethylaminopyridine (120 μmol) was added to a solution of **19** (35.0 mg, 60.0 μmol) in dry toluene (2 mL), and the mixture was stirred for 30 min at 80°C. The solvent was evaporated, the residue was washed with water (3*10 mL) and dried over magnesium sulfate. The solution was concentrated to dryness and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 98:2) to give **20** as a purple solid (m = 36.0 mg, yield = 50 %). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 0.94 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.05 (t, $^3J_A = 7.5$ Hz, 6H), 1.34 (s, 6H), 1.36 (s, 6H), 2.15 (s, 3H), 2.24 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 2.43 (qd, $^3J_A = 7.3$ Hz, $^2J_B = 12.2$ Hz, 1H), 2.45 (qd, $^3J_A = 7.5$ Hz, $^2J_B = 12.2$ Hz, 1H), 2.54 (t, $^4J = 2.5$ Hz, 1H), 3.01 (s, 6H), 3.85 (s, 6H), 3.97 (s, 3H), 4.74 (d, $^4J = 2.5$ Hz, 2H), 6.78 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H), 6.79 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 1H), 7.01 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 2H), 7.03 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 1H), 7.37 (d, $^3J = 8.9$ Hz, 2H), 7.40 (dd, $^3J_C = 7.9$ Hz, $^4J_D = 1.5$ Hz, 1H), 7.78 (dd, $^3J_C = 7.9$ Hz, $^4J_D = 1.5$ Hz, 1H), 7.94 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H), 8.20 (dd, $^3J_C = 7.9$ Hz, $^4J_D = 1.5$ Hz, 1H), 8.28 (dd, $^3J_C = 7.9$ Hz, $^4J_D = 1.5$ Hz, 1H). ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3): δ 1.18 (d, $^1J = 37.9$ Hz). ESI-MS: m/z = 561.4 $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2-\text{OTf}]^+$, 683.4 $[\text{M}-\text{OTf}]^+$. HRMS (ESI) 683.35465, calculated for $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{BFN}_4\text{O}_3^+$ 683.35705. UV-Vis (THF) λ nm ($\epsilon \times 10^{-3}$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 594 (56), 402 (9), 345 (18), 291 (25), 242 (20).

Compound 21. 5.20 μL of a 100 mM solution of **N₃-BBN** (DMF, 0.52 μmol), 5.20 μL of a 100 mM solution of compound **20** (DMF, 0.52 μmol), 2.80 μL of a 200 mM solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (DMF, 0.57 μmol) and 0.30 mg of sodium ascorbate (1.51 μmol) were mixed together. The mixture was stirred at room temperature for 1 h and the reaction was monitored by HPLC. The crude product was purified by HPLC from 40 % to 70 % of B over 30 min to give **21** as a red solid (conversion (HPLC) = 59 %, purity = 95.4 %, $t_R = 3.37$ min). ESI-MS: m/z 1671.78 $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2-\text{OTf}-\text{TFA}]^+$, 1793.76 $[\text{M}-\text{OTf}-\text{TFA}]^+$. HRMS (ESI) 1793.90512, calculated for $\text{C}_{91}\text{H}_{119}\text{BFN}_{20}\text{O}_{15}\text{S}^+$ 1793.89700.

Acknowledgements

The Ministère de l'Enseignement et de la Recherche, the Université de Bourgogne and the Conseil Régional de Bourgogne through the 3MIM Project are acknowledged. PDH thanks the Natural Sciences and Engineering Research Council for funding. BB thanks the Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche for PhD grants. Fanny Chaux, Marie José Penouilh, Nicolas Maindrion, Marc Pirrota and Damien Lhenry are warmly acknowledged for technical support. PDH thanks the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for fundings.

Keywords: BODIPY dyes, bimodal PET/optical imaging, bombesin

References

- [1] M. L. James, S. S. Gambhir, *Physiol. Rev.* **2012**, 92, 897-965.
- [2] a) S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 320-330; b) F. Dolle, *Curr. Pharm. Des.* **2005**, 11, 3221-3235; c) P. W. Miller, N. J. Long, R. Vilar; A. D. Gee, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8998-9033; d) F. Dolle, D. Roeda, B. Kuhnast, M.-C. Lasne, *Fluorine and Health*, **2008**, 3-65.
- [3] G. E. Smith, H. L. Sladen, S. C. G. Biagini, P. J. Blower, *Dalton Trans.* **2011**, 40, 6196-6205.
- [4] S. Keereweer, P. B. A. A. Van Driel, T. J. A. Snoeks, J. D. F. Kerrebijn, J. R. J. Baatenburg, A. L. Vahrmeijer, H. J. C. M. Sterenborg, C. W. G. M. Lowik, *Clin. Cancer Res.* **2013**, 19, 3745-3754.
- [5] a) A. Azhdarinia, P. Ghosh, S. Ghosh, N. Wilganowski, E. M. Sevick-Muraca, *Mol. Imaging Biol.* **2012**, 14, 261-276; b) M. Ogawa, C. A. S. Regino, J. Seidel, M. V. Green, W. Xi, M. Williams, N. Kosaka, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 2177-2184; c) L. Sampath, S. Kwon, M. A. Hall, R. E. Price, E. M. Sevick-Muraca, *Transl. Oncol.* **2010**, 3, 307-217; d) H. Hong, Y. Zhang, G. W. Severin, Y. Yang, J. W. Engle, G. Niu, R. J. Nickles, X. Chen, B. R. Leigh, T. E. Barnhart, W. Cai, *Mol. Pharmaceutics* **2012**, 9, 2339-2349; e) Y. Zhang, H. Hong, G. W. Severin, J. W. Engle, Y. Yang, S. Goel, A. J. Nathanson, G. Liu, R. J. Nickles, B. R. Leigh, T. E. Barnhart, W. Cai, *Am. J. Transl. Res.* **2012**, 4, 333-346.
- [6] a) Z. Zhang, K. Liang, S. Bloch, M. Berezin, S. Achilefu, *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16, 1232-1239; b) J. Kuil, A. H. Velders, F. W. B. van Leeuwen, *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 1709-1719.
- [7] a) S. C. Ghosh, P. Ghosh, N. Wilganowski, H. Robinson, M. A. Hall, G. Dickinson, K. L. Pinkston, B. R. Harvey, E. M. Sevick-Muraca, A. Azhdarinia, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 406-416; b) H. Xu, P. K. Eck, K. E. Baidoo, P. L. Choyke, M. W. Brechbiel, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 5176-5181.
- [8] a) R. P. Haughland, *Handbook of Molecular Probes and Research Products*, **2002**, 9th Ed.; b) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4891-4932; c) N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1130-1172.
- [9] J. O. Escobedo, O. Rusin, S. Lim, R. M. Strongin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 64-70.
- [10] Y. R. Luo, *Handbook of Chemical Bond Energies*, **2007**.
- [11] S. Liu, T.-P. Lin, D. Li, L. Leamer, H. Shan, Z. Li, F. P. Gabbai, P. S. Conti, *Theranostics*, **2013**, 3, 181-189.
- [12] T. W. Hudnall, T.-P. Lin, F. P. Gabbai, *J. Fluorine Chem.* **2010**, 131, 1182-1186.
- [13] Z. Li, T.-P. Lin, S. Liu, C.-W. Huang, T. W. Hudnall, F. P. Gabbai, P. S. Conti, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9324-9326.

- [14] J. A. Hendricks, E. J. Keliher, D. Wan, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, R. Mazitschek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4603-4606.
- [15] T. W. Hudnall, F. P. Gabbai, *Chem. Commun.* **2008**, 4596-4597.
- [16] Z. Li, F. P. Gabbai, P. S. Conti, T. W. Hudnall, T.-P. Lin, S. Liu, C.-W. Huang, *PCT Int. Appl.* **2013**, WO 2013012754 A1 20130124
- [17] a) A. Eggenspieler, A. Takai, M. E. El-Khouly, K. Ohkubo, C. P. Gros, C. Bernhard, C. Goze, F. Denat, J. M. Barbe, S. Fukuzumi, *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 3889-3898; b) B. Brizet, C. Bernhard, Y. Volkova, Y. Rousselin, P. D. Harvey, C. Goze, F. Denat, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7729-7737.
- [18] a) C. Bernhard, C. Goze, Y. Rousselin, F. Denat, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8267-8269; b) V. Duheron, M. Moreau, B. Collin, W. Sali, C. Bernhard, C. Goze, T. Gautier, J.-P. Pais de Barros, V. Deckert, F. Brunotte, L. Lost, F. Denat, *ACS Chem. Biol.* **2014**. ASAP, DOI: 10.1021/cb400779j
- [19] R. Schirmacher, G. Bradmoeller, E. Schirmacher, O. Thews, J. Tillmanns, T. Siessmeier, H. G. Bucholz, P. Bartenstein, B. Waengler, C. M. Niemeyer, K. Jurkschat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6047-6050.
- [20] S. Kolenen, O. A. Bozdemir, Y. Cakmak, G. Barin, S. Erten-Ela, M. Marszalek, J.-H. Yum, S. M. Zakeeruddin, M. K. Nazeeruddin, M. Graetzel, E. U. Akkaya, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 949-954.
- [21] J. W. Seo, B. S. Lee, S. J. Lee, S. J. Oh, D. Y. Chi, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 71-76.
- [22] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249-1262.
- [23] a) A. A. Ahmad Fuaad, F. Azmi, M. Skwarczynski, I. Toth, *Molecules* **2013**, *18*, 13148-13174; b) D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, ASAP. DOI: 10.1021/cb400828a
- [24] L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.
- [25] V. Sancho, A. Di Florio, T. W. Moody, R. T. Jensen, *Curr. Drug. Deliv.* **2011**, *8*, 79-134.
- [26] S. Guard, K. J. Watling, W. Howson, *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *240*, 177-184.
- [27] a) A. Coskun, E. U. Akkaya, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4947-4949; b) Z. Dost, S. Atilgan, E. U. Akkaya, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 8484-8488.
- [28] J.-Y. Liu, E. A. Ermilov, B. Roder, D. K. P. Ng, *Chem. Commun.* **2009**, 1517-1519.
- [29] a) W. Baeumler, A. Penzkofer, *Chem. Phys.* **1990**, *140*, 75-97; b) K. H. Drexhage, *J. Res. Natl. Bur. Stand. A, Phys. Chem.* **1976**, *80*, 421-428; c) D. Magde, J. H. Brannon, T. L. Cremers, J. Olmsted, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83*, 696-699.
- [30] Z. M. Otwinowski, *Macro. Cryst.*, **1997**, *276*, 307.
- [31] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann, *J. Appl. Cryst.* **2009**, *42*, 339-341.
- [32] G. M. Sheldrick, *Acta Cryst. A* **2008**, *64*, 112-122.

- [33] Y. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099-3108.
- [34] A. M. Brouwer, *Pure Appl. Chem.* **2011**, 83, 2213-2228.
- [35] F. P. Schäfer, *Topics in Applied Physics: Structure and Properties of Laser Dyes*, **1990**, Vol 1.
- [36] D. R. Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*, **1957**, Ed. Chemical Rubber Publishing Co, Berlin.
- [37] G. Clavé, H. Boutal, A. Hoang, F. Perraut, H. Volland, P-Y Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 3065-3078.
- [38] a) J. Fan, M. Hu, P. Zhan, X. Peng, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 29-43; b) Z. Dost, S. Atilgan, E. U. Akkaya, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 8484-8488; c) X. L. Zhang, Y. Xiao, X. H. Qian, *Org. Lett.* **2008**, 10, 29-32.

2.3 Données supplémentaires

2.3.1 Test d'introduction d'une fonction isothiocyanate sur un BODIPY-DMAP distyryle.

En parallèle de la synthèse du composé **6** porteur d'une fonction isothiocyanate, la synthèse d'un composé similaire, en série distyryle, a été réalisée.

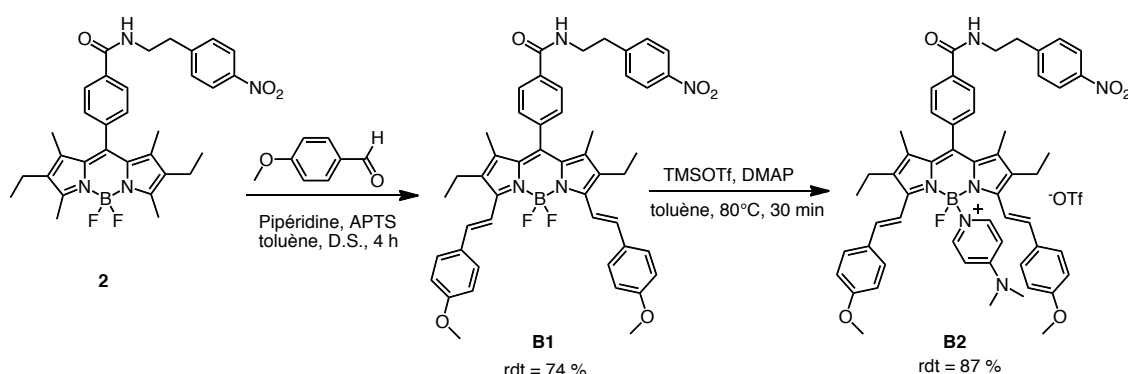


Schéma 15

Le composé **B2** a été obtenu à partir du composé **2** avec un rendement global de 68 %. Des tests de réduction de la fonction nitrophényle ont ensuite été réalisés sur les composés **B1** et **B2**. L'hydrogénation catalysée au palladium sur charbon du groupe nitro du composé **B2** conduit à la dégradation du composé, le produit désiré porteur d'une fonction aniline n'a pas été détecté par spectrométrie de masse. Comme pour le composé **3**, ce composé porteur d'un groupement DMAP ne résiste pas aux conditions d'hydrogénation. Concernant le composé **B1**, l'hydrogénation conduit à la formation du produit désiré, mais également des produits de mono- et de diréduction des fonctions alcène portées par les groupements styryles, caractérisés par spectrométrie de masse (Schéma 16).

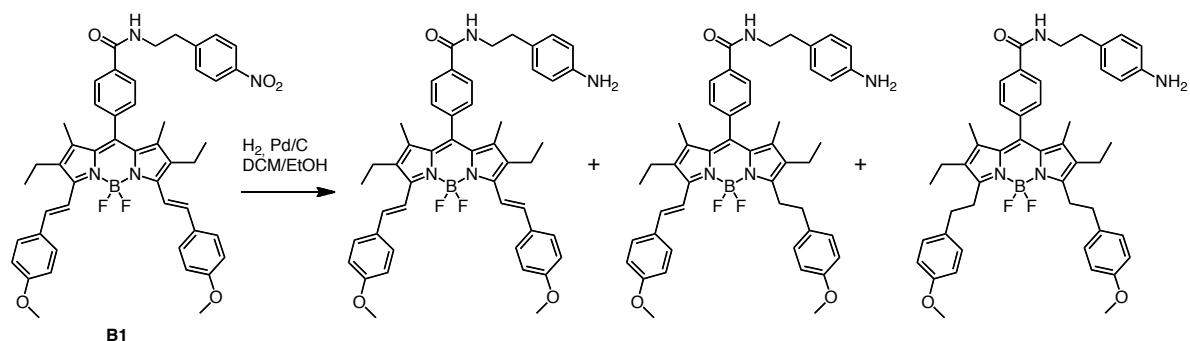


Schéma 16

Ce problème de réduction non sélective a déjà été décrit auparavant.¹⁶⁷ Le produit désiré, porteur d'une fonction aniline, ainsi que les produits de mono- et de di-réduction des fonctions alcène, possèdent des rapports frontaux très proches et sont difficiles à séparer par chromatographie.

D'autres voies ont été testées, par exemple un mélange Zn/CaCl₂ dans l'éthanol, conditions décrites dans la littérature pour la réduction des fonctions nitro.¹⁶⁸ Cette approche a cependant conduit à la dégradation du produit de départ. Un mélange hydrazine/nickel de Raney connu pour réduire spécifiquement la fonction nitro sans réduire les alcènes, a été testé, conduisant également à la dégradation du composé de départ (Schéma 17).¹⁶⁹

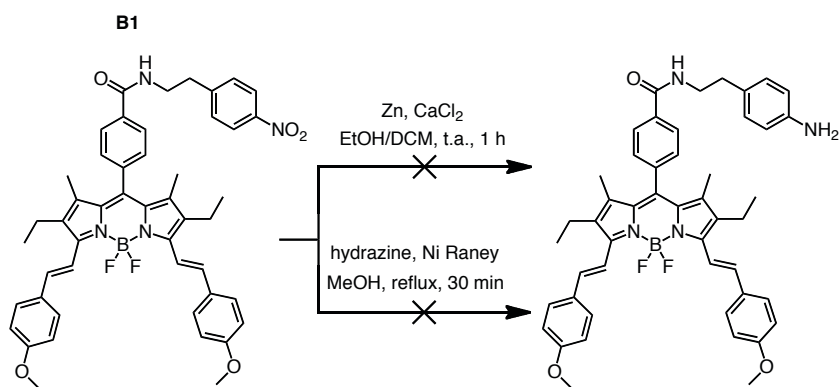


Schéma 17

Les difficultés rencontrées pour la réduction sélective du groupe nitro nous ont ainsi confortés dans l'approche visant à introduire une fonction de greffage de type alcyne plutôt que isothiocyanate sur la position *meso* du BODIPY.

2.3.2 Perspectives : vers des agents bimodaux optique/TEP multivalents.

Lors des travaux de bioconjugaison des synthons BODIPY-DMAP sur la bombésine, nous avons également envisagé une approche multivalente. Les ligands multivalents consistent en un assemblage de plusieurs vecteurs sur la même molécule. Ils possèdent généralement des interactions avec leurs récepteurs-cible plus importantes que les ligands monovalents (composés d'un seul vecteur).^{170,171}

Nous avons envisagé la synthèse d'un BODIPY-DMAP porteur de deux bombésines, à partir d'un synthon BODIPY-DMAP distyryle portant deux fonctions alcyne. Le BODIPY distyryle **B3** a été obtenu avec un rendement de 40 %, puis l'introduction de la DMAP (composé **B4**) a été réalisée avec un rendement de 19 % (Schéma 18).

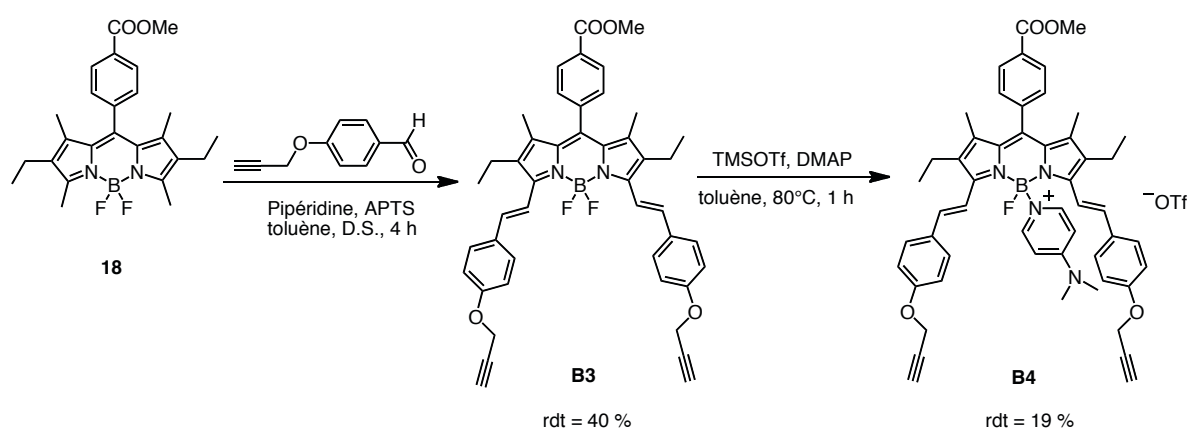
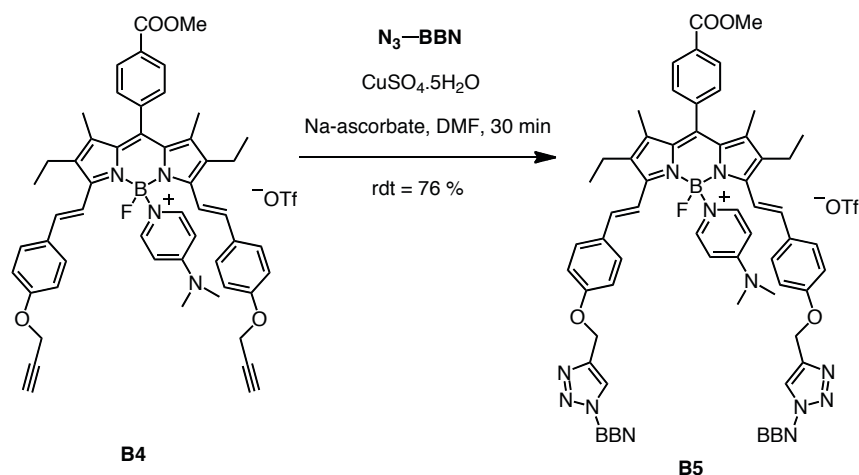


Schéma 18

La bioconjugaison du composé **B4** a ensuite été réalisée avec un rendement de 76 %. Le composé **B5** a été caractérisé par spectrométrie de masse ESI (Schéma 19).



L'approche bivalente utilisée pour la synthèse du composé **B5** peut permettre de renforcer l'interaction de la sonde avec ses récepteurs cibles. Elle augmente également l'hydrosolubilité des BODIPY distyryle. Le composé **B5** est hydrosoluble à pH < 7, ce qui s'explique par la protonation du motif imidazole porté par la bombésine. A ce sujet, notons que les différents BODIPY bioconjugués à la bombésine décrits dans l'article III présentent une solubilité dans l'eau qui diminue à mesure que l'on ajoute des groupements styryles sur le BODIPY. Le composé **12** qui ne comporte pas de groupement styryle est hydrosoluble, alors que les BODIPY mono- et distyryle **21** et **17** sont respectivement solubles dans un mélange eau-DMSO 9 : 1 et 1 : 1. Ces résultats confirment le problème d'hydrophobicité des BODIPY NIR décrits dans le chapitre I.2.1. Nous avons cherché à modifier la structure du cœur BODIPY dans l'optique d'améliorer la solubilité des bioconjugués ciblés. L'approche des *O*-BODIPY distyryle portant des groupements PEG (composés **15** et **16** de l'article 1) décrite précédemment est peu adaptée à l'hydrosolubilisation des BODIPY-DMAP, étant donné qu'un seul groupement PEG peut être introduit sur l'atome de bore de ces composés. Dès lors, nous avons envisagé une approche différente, basée sur l'introduction de sels d'ammonium.

2.3.3 Stratégie envisagée pour améliorer l'hydrosolubilité des BODIPY styryle.

Comme expliqué précédemment, l'introduction de groupements styryles sur les BODIPY permet de décaler leurs domaines d'absorption et d'émission vers le proche infra-rouge, mais augmente en contre-partie leur hydrophobicité. Des stratégies d'hydrosolubilisation du cœur BODIPY doivent donc être mises au point. Nous avons ainsi cherché à valoriser le cycle aromatique porté par les groupements styryles pour l'introduction de groupements hydrosolubilisants. Pour cela, nous avons utilisé des

BODIPY mono- et distyryle préalablement synthétisés (**B6** et **B7** respectivement), porteurs de groupements diméthylaniline (Schéma 20). Nous avons cherché à quaterniser les fonctions aniline sous forme de sels d'ammonium, groupements connus pour leur hydrophilicité,⁹⁴ puis à évaluer l'effet de la quaternisation sur les propriétés de solubilité et d'émission de fluorescence.

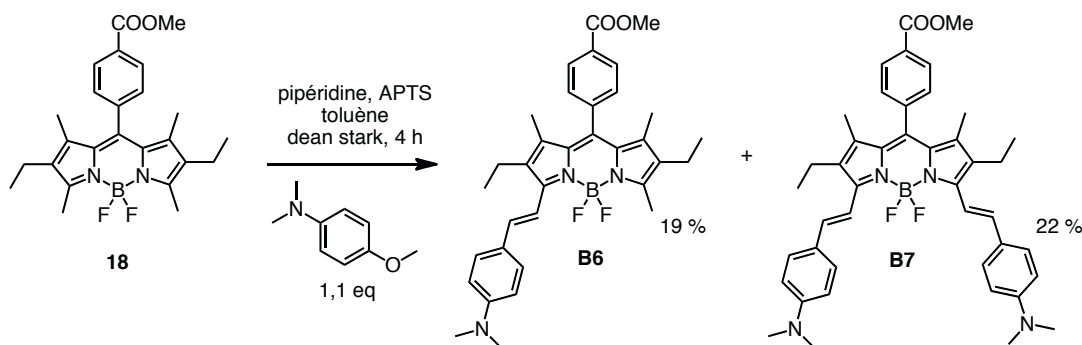


Schéma 20

D'un point de vue photophysique, les fonctions aniline provoquent un fort déplacement bathochrome des bandes d'absorption et d'émission, le doublet non-liant porté par l'azote participant à la délocalisation électronique dans le système conjugué. Cette transition comporte une forte contribution provenant d'un transfert de charge intramoléculaire (ICT pour Intramolecular Charge Transfer) résultant d'une interaction donneur-accepteur respectivement entre le groupement aniline et le BODIPY, ce qui explique la largeur des bandes d'absorption et d'émission observées pour les composés **B6** et **B7**.^{89,172} La protonation de l'atome d'azote a pour effet un déplacement hypsochrome des bandes d'absorption et d'émission puisque le doublet non-liant de l'azote ne participe plus à la délocalisation d'électrons. La démarche vise à alkyler les groupements diméthylaniline afin de stabiliser la forme quaternisée, quelque soit le pH. La littérature présente notamment des exemples de BODIPY hydrosolubles porteurs d'au moins une fonction iodure,¹⁷³ triflate,¹⁶¹ bromure,⁹⁴ hexafluorophosphate¹⁷² et sulfonate¹⁷⁴ de triméthylammonium.

Le caractère faiblement nucléophile des fonctions aniline, lié au fait que le doublet non-liant participe à la délocalisation électronique du système aromatique, impose l'utilisation d'agents méthylants forts. La propanesultone n'ayant pas permis de quaterniser les fonctions aniline, le triflate de méthyle a donc été utilisé (Schéma 21).

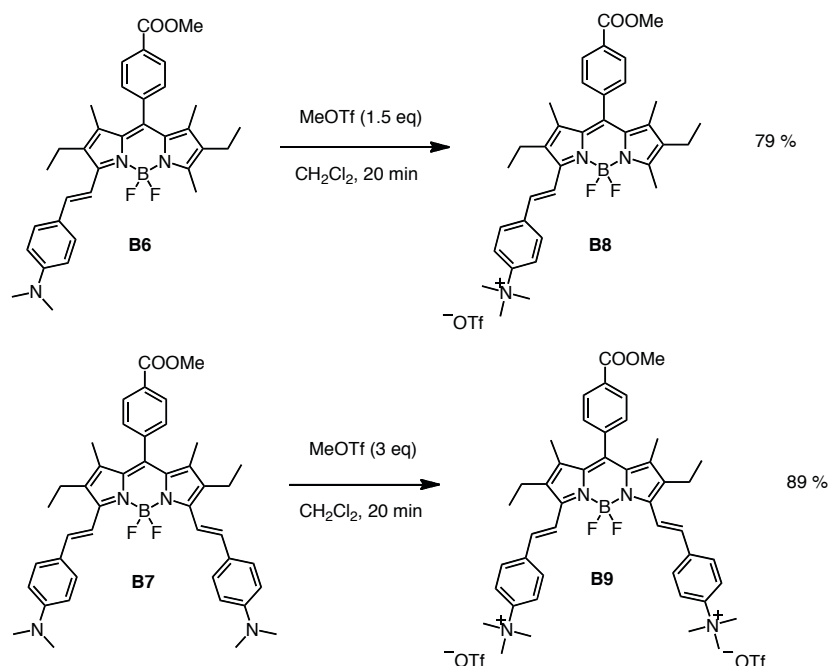


Schéma 21

La formation du double sel de triméthylphénylammonium est observée dans le cas du composé **B7** par la formation d'un précipité dans le dichlorométhane. Dans le cas du composé **B6**, c'est surtout le changement de couleur (du vert au rose) qui permet de suivre l'avancement de la réaction. Cependant, aucun précipité ne se forme au cours de la réaction. La Figure 49 montre que la quaternisation des fonctions aniline provoque un déplacement hypsochrome des maxima d'absorption et d'émission.

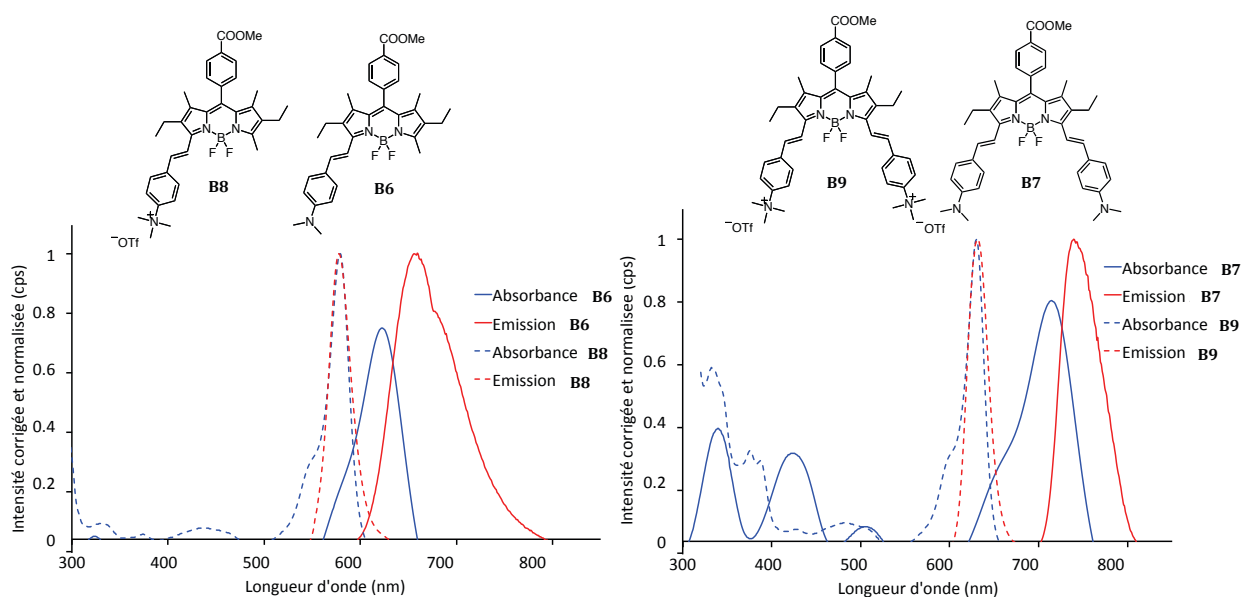


Figure 49 : déplacement hypsochrome des bandes d'absorption et d'émission après quaternisation.

Un autre effet notable de la quaternisation est la diminution du déplacement de Stokes comme le montre le Tableau 7. Dans le même temps, une augmentation remarquable du rendement quantique de fluorescence est observée pour les deux composés **B8** et surtout **B9** par rapport aux composés **B6** et **B7**.

Tableau 7 : propriétés photophysiques des composés **B6**, **B8**, **B7** et **B9**.

Composé	Solvant	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{abs}}$ (nm)	Φ_F
B6	2-MeTHF	619	668	49	0.43
B8	2-MeTHF	578	588	10	0.69
B7	2-MeTHF	711	754	43	0.01
B9	MeOH	631	643	12	0.40

La référence utilisée pour les mesures de Φ_F est le crésyl violet, ($\Phi_F = 0.54$ dans le méthanol).¹⁷⁵

Le changement des propriétés de solubilité a été confirmé par des tests de solubilité dans différents solvants, dont l'eau (Tableau 8).

Tableau 8 : solubilité des composés **B6**, **B8**, **B7** et **B9**.

Solvant	B6	B8	B7	B9
Hexane	non	non	non	non
CH ₂ Cl ₂	oui	oui	oui	non
Et ₂ O	oui	oui	non	non
Acétone	non	oui	faible	oui
CH ₃ CN	faible	oui	non	oui
Ethanol	non	oui	non	oui
Méthanol	non	oui	non	oui
Eau	non	non	non	non

Bien que les composés quaternisés **B8** et **B9** ne soient pas hydrosolubles, ils sont solubles dans les solvants polaires comme l'acétonitrile, l'éthanol et le méthanol. La quaternisation des composés **B6** et **B7** permet donc une diminution notable de leur hydrophobicité. Cette approche pourrait permettre d'améliorer les propriétés de solubilité des BODIPY styryle bioconjugués décrits précédemment. Ces perspectives sont représentées dans les deux schémas rétrosynthétiques suivants. La Figure 50 décrit la rétrosynthèse d'un BODIPY-DMAP monoquaternisé conjugué à la bombésine. Elle implique la formation, à partir du composé **B6**, d'un BODIPY portant deux groupements styryles différents, dont l'un porte une fonction alcyne pour la bioconjugaison, et l'autre porte une fonction aniline pour la quaternisation.

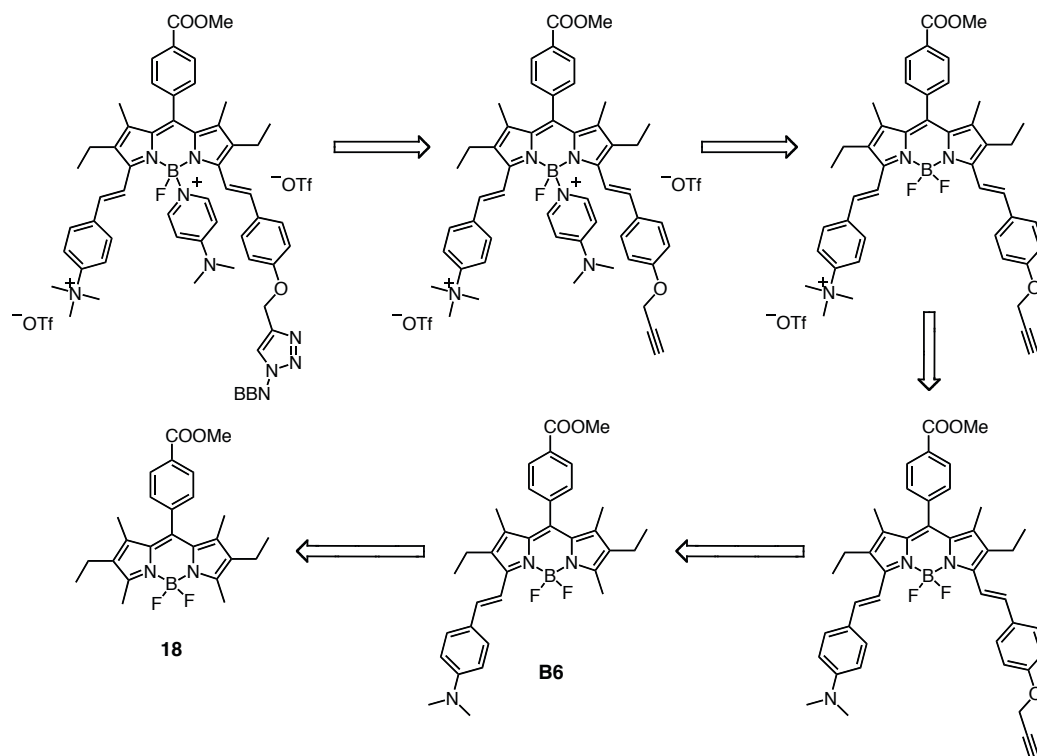


Figure 50 : rétrosynthèse d'un BODIPY-DMAP bioconjugué monoquaternisé.

La deuxième synthèse envisagée implique l'introduction de deux groupements styryles portant une fonction aniline à partir du composé **8** (Figure 51). Par rapport à l'approche décrite précédemment cette méthode permettrait l'introduction d'un deuxième sel d'ammonium sur le BODIPY distyryle, réduisant d'autant plus son caractère hydrophobe. D'un point de vue synthétique, l'introduction de deux groupements styryles identiques permet d'obtenir de meilleurs rendements de réaction que pour l'introduction de deux groupements styryle différents.

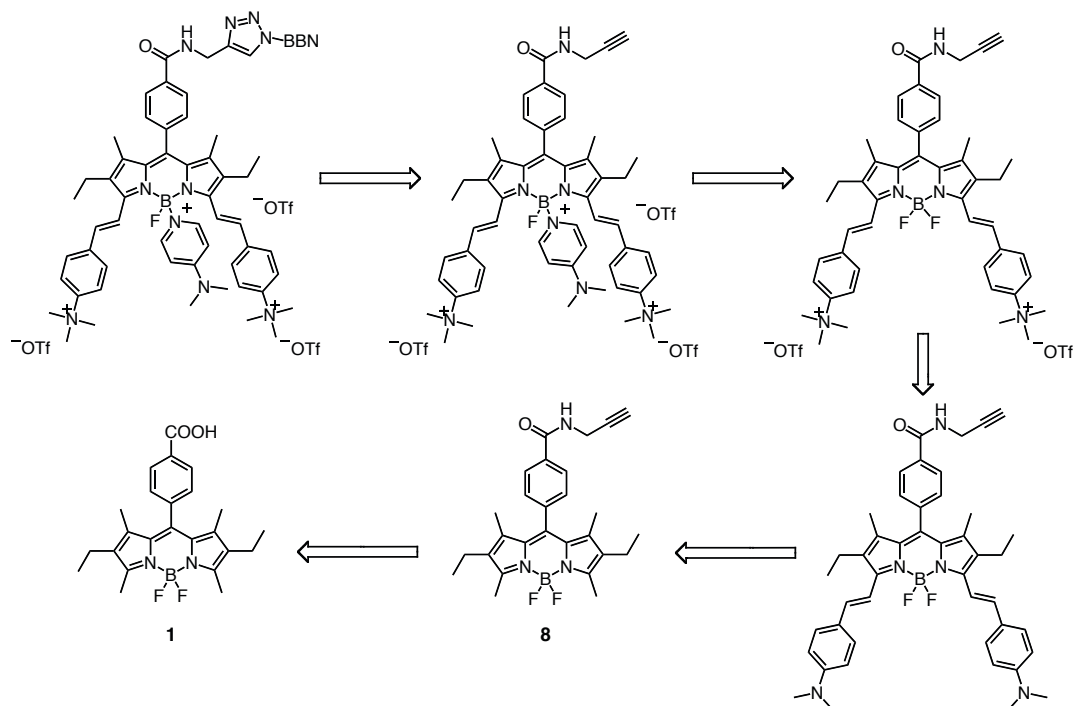


Figure 51 : rétrosynthèse d'un BODIPY-DMAP bioconjugué diquaternisé.

2.4 Conclusion

Les premières conclusions à tirer de ces résultats concernent les conditions de synthèse supportées par le groupement DMAP. Celui-ci a résisté à diverses conditions réactionnelles, notamment à la présence de thiophosgène (groupement électrophile) lors de la transformation de la fonction amine en fonction isothiocyanate, ainsi que lors des différentes réactions de bioconjugaison réalisées par « *chimie-click* », en présence de sulfate de cuivre, et d'ascorbate de sodium. En revanche, le groupement DMAP est sensible à la présence d'amines (propylamine et diisopropylamine). L'hydrogénation catalysée au palladium sur charbon a également conduit à la dégradation du motif B-DMAP.

Le groupement DMAP s'avère être un bon groupement partant en présence d'agents fluorants. Parmi les différentes conditions de fluoration testées, l'utilisation de fluorure de potassium en présence de kryptofix [222] s'est révélée particulièrement efficace. Il est cependant nécessaire de travailler dans des conditions anhydres pour éviter la formation de produits secondaires de type B-OH.

Ces résultats permettent également d'affirmer que la bombésine est stable dans ces conditions de fluoration. De plus, la fluoration se produit spécifiquement sur l'atome de bore du BODIPY, et n'affecte pas une autre partie de la molécule. Cependant, bien que les conditions de fluoration à froid employées au cours de ce travail se rapprochent des conditions utilisées en radiofluoration, on ne peut pas affirmer que ces résultats seront reproductibles lors d'un marquage à chaud. Pour cela, des tests de radiofluoration doivent être réalisés sur les différents BODIPY-DMAP bioconjugués. Ces tests permettraient également de définir les conditions de radiofluoration optimales pour la formation de [^{18}F]BODIPY à partir des précurseurs BODIPY-DMAP.

D'autres perspectives concernent l'utilisation de synthons BODIPY-DMAP mono- et distyryle, possédant une absorption et une émission de fluorescence dans le proche-infrarouge. Plusieurs composés de ce type ont été bioconjugués à la bombésine avec de bons rendements. Ces systèmes doivent toutefois être optimisés, en particulier en introduisant des groupements hydrosolubilisants sur le squelette BODIPY.

Il serait également intéressant de greffer par « *chimie-click* » des BODIPY-DMAP sur d'autres peptides vecteurs, et de déterminer si les BODIPY-DMAP bioconjugués obtenus résistent aux conditions de radiofluoration. Si c'est le cas, ces composés pourraient constituer des plate formes bimodales optique/TEP radiomarquables en une étape, et spécifiques de différentes zones d'intérêt. Notons à ce propos que le groupe de Weissleder a très récemment reporté la radiofluoration d'un BODIPY portant un inhibiteur de la PARP (poly-ADP-ribose-polymérase-1), molécule actuellement développée pour le traitement des cancers du sein et de l'ovaire.¹⁷⁶

Contributions à l'article II.

Christine Goze est à l'origine de l'inspiration qui a conduit à ces travaux de recherche. Victor Goncalves, Claire Bernhard et Christine Goze ont participé à l'interprétation des résultats.

Mon rôle dans ces travaux a tout d'abord consisté à synthétiser et caractériser les différents composés présentés.

Concernant les réactions de couplage avec la bombésine, j'ai réalisé la synthèse et la caractérisation des différents BODIPY-bombésine. Victor Goncalves, Maître de Conférence à l'ICMUB, m'a apporté de nombreux conseils, en particulier concernant la purification par HPLC. Il a également réalisé la synthèse de la bombésine-N₃. Yoann Rousselin a déterminé la structure cristallographique du composé **8**.

J'ai réalisé les différentes études photophysiques présentées dans ce chapitre.

Concernant la rédaction de l'article II, j'ai participé à la rédaction des différentes parties du présent manuscrit, avec une contribution principale pour la rédaction des parties « synthèse », « résultats photophysiques » et du « supporting information ». Christine Goze, Claire Bernhard, Victor Goncalves et Yoann Rousselin ont participé à la rédaction de l'article ; Franck Denat et Pierre D. Harvey l'ont corrigé.

3 Conclusion du chapitre II

Au cours des travaux présentés dans ce chapitre II, nous avons cherché des moyens d'optimisation de la structure du BODIPY en vue d'applications pour l'imagerie médicale. Des voies de synthèse permettant l'hydrosolubilisation, l'introduction de la bimodalité et la bioconjugaison des BODIPY ont été explorées. Certaines d'entre elles ont ensuite été appliquées à des BODIPY distyryle émettant dans les longueurs d'onde du proche infra-rouge. La chimie du bore a particulièrement été utilisée, notamment pour l'introduction de groupements PEG hydrosolubilisants par *O*-fonctionnalisation. Nous avons également montré que les *O*-BODIPY conservent, même dans l'eau, leurs bonnes propriétés de fluorescence. Cette méthode originale de fonctionnalisation des BODIPY n'a cependant pas permis l'introduction de tétraazacycloalcanes, agents chélatants permettant de complexer un radiométal. Une autre stratégie d'élaboration de précurseurs pour l'imagerie bimodale optique/TEP, à base de ^{18}F -BODIPY, a été étudiée. L'introduction sur l'atome de bore du BODIPY d'un groupement DMAP, un groupe partant en présence d'ions fluorures, est une des stratégies récemment décrite dans la littérature. Nous avons montré que ce groupement résiste à certaines conditions réactionnelles, notamment aux conditions de « chimie click » utilisées lors de la bioconjugaison des BODIPY-DMAP sur la bombésine. La fluoration peut alors être réalisée spécifiquement sur l'atome de bore avec un bon rendement, sans dégrader le BODIPY bioconjugué. Enfin, des études *in vitro* ont permis de montrer que le greffage du BODIPY sur la bombésine affecte peu l'affinité du vecteur pour son récepteur-cible. Ces résultats encourageants nécessitent aujourd'hui que des essais de radiofluoration soient réalisés.

CHAPITRE III

TRANSFERTS D'ÉNERGIE DANS LES

SYSTÈMES BICHROMOPHORQUES À

BASE DE BODIPY

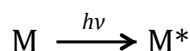
Les BODIPY possèdent des propriétés spectroscopiques remarquables : leur absorption est importante, leurs rendements quantiques de fluorescence sont généralement supérieurs à 50 %, et il est possible de moduler leurs longueurs d'onde d'absorption et d'émission dans le spectre du visible et du proche-infrarouge. De plus, ces composés offrent de larges possibilités synthétiques : de nombreux groupements réactifs peuvent être introduits et il est possible de réaliser des mono- ou di-fonctionnalisation, dépendamment de la position réactive mise en jeu sur le fluorophore.

Ces caractéristiques permettent d'expliquer pourquoi les BODIPY sont largement utilisés pour l'étude des propriétés spectroscopiques de systèmes multichromophoriques.^{177,178} Les différentes synthèses décrites dans les articles I et II nous ont permis d'accéder à une gamme de BODIPY précurseurs possédant diverses fonctions réactives, et différents gammes de longueurs d'onde d'absorption et d'émission. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Jean-Michel Barbe et Claude Gros, nous avons valorisé ces composés en les couplant à d'autres chromophores dérivés de porphyrines et de corroles. Une partie des travaux réalisés à l'Université de Sherbrooke a consisté à étudier les propriétés spectroscopiques de ces systèmes multichromophoriques. Différents outils tels que la mesure du temps de vie de fluorescence, ou l'optimisation de géométrie par DFT (théorie de la fonctionnelle de densité), ont notamment été utilisés afin d'expliquer certains phénomènes de transfert d'énergie.

Deux articles sont ici présentés. L'article III décrit deux systèmes BODIPY-bisporphyrine obtenus par *O*-fonctionnalisation. L'article IV présente différents systèmes BODIPY-corrole obtenus par « *chimie-click* ». Quelques rappels théoriques de photophysique seront tout d'abord présentés, afin d'introduire cette partie axée sur l'étude des phénomènes de transfert d'énergie.

1 Le transfert d'énergie photoinduit

Le passage d'une molécule de son état fondamental M à son état excité M* nécessite l'absorption d'un photon:



L'état excité M* possède des propriétés différentes de celles de l'état fondamental. Un état excité est généralement beaucoup plus réactif, son temps de vie est donc plus court. Le temps de vie de l'état excité joue un rôle important, puisqu'il représente la fenêtre de temps expérimentale à travers laquelle les processus de désexcitation peuvent être observés.

On distingue deux sortes de processus de désexcitation :

Les processus intramoléculaires dont certains ont été mentionnés dans le chapitre I.1.1.1 (désexcitation radiative et non radiative) interviennent à l'échelle de la molécule elle-même.

Les processus intermoléculaires mettent en jeu l'interaction de la molécule excitée M* avec une autre molécule Q. Il s'agit des mécanismes intermoléculaires photoinduits. La plupart d'entre eux sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9: Principaux processus photophysiques responsables de l'inhibition de fluorescence.¹⁷⁹

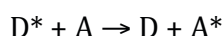
Processus photophysiques	M* + Q → produits	Donneur	Accepteur
	\Downarrow \Downarrow \Downarrow		
Collision	M* + Q → M + Q + chaleur		
Transfert d'électron	D* + A → D ^{•+} + A ^{•-} A* + D → A ^{•-} + D ^{•+}	D* D	A A*
Formation d'excimère	M* + M → D* (MM)*		
Formation d'exciplexe	D* + A → (DA)* A* + D → (DA)*	D* D	A A*
Transfert de proton	AH* + B → A ⁻ * + BH ⁺ B* + AH → BH ^{•+} + A ⁻	AH* AH	B B*
Transfert d'énergie	D* + A → D + A* M* + M → M + M*	D* M*	A M

Notons que le mot inhibition s'applique seulement à la molécule initialement excitée, il est également utilisé si l'interaction avec Q donne naissance à une espèce fluorescente. D = donneur ; A = accepteur ; Y = acide de Brönsted ; Z = base de Brönsted.

Plusieurs paramètres intrinsèques au milieu parmi lesquels la concentration en espèces, la température et la viscosité du solvant régissent les processus d'inhibition de fluorescence. Plusieurs livres sont consacrés à ces divers mécanismes.¹⁷⁹⁻¹⁸¹ Seuls les mécanismes de transfert d'énergie seront abordés dans ce chapitre.

1.1 Définition

Le transfert d'énergie est un processus impliquant le passage d'énergie entre une molécule excitée « donneur » D^* vers une molécule « accepteur » A .



Un transfert d'énergie peut se produire quelles que soient la nature et la multiplicité des états D^* et A , à condition toutefois que l'énergie de D^* soit supérieure à celle de A^* , que le transfert d'énergie soit plus rapide que la durée de vie de D^* et qu'il y ait conservation du spin. Après le transfert, le donneur retourne toujours à l'état fondamental. Le transfert d'énergie nécessite l'existence d'un recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur.

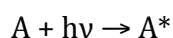
Le transfert d'énergie est un processus bichromophorique qui implique un donneur et un accepteur. Le donneur et l'accepteur peuvent être liés au sein d'une même molécule. Dans ce cas, les mêmes mécanismes sont mis en jeu.

Expérimentalement, le transfert d'énergie est quantifié par la constante de transfert d'énergie k_{ET} et s'exprime en fonction de τ_D (temps de vie de fluorescence du donneur en présence de l'accepteur) et de τ_D^0 (temps de vie de fluorescence du donneur seul) :

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} - \frac{1}{\tau_D^0}$$

1.1.1 Distinction entre transfert d'énergie radiatif et non radiatif.

Il existe plusieurs types de transfert d'énergie. Il faut tout d'abord différencier le transfert radiatif et le transfert non radiatif. Le transfert radiatif, peu efficace, implique que l'accepteur réabsorbe la lumière émise par le donneur :



Une des conséquences du transfert radiatif est une légère diminution de l'intensité de fluorescence du donneur, et ce uniquement dans la zone de recouvrement

donneur-accepteur. Un tel transfert ne requiert aucune interaction entre les partenaires, mais il dépend de la concentration des espèces et du recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. A l'inverse, le transfert d'énergie non radiatif nécessite des interactions électroniques spécifiques entre le donneur et l'accepteur.

1.1.2 Transfert d'énergie non radiatif.

Le transfert d'énergie non radiatif de l'énergie d'excitation ne peut se produire que si le spectre d'émission du donneur recouvre partiellement le spectre d'absorption de l'accepteur, afin qu'il existe une correspondance en énergie entre des transitions vibroniques du donneur et des transitions vibroniques de l'accepteur. De telles transitions sont couplées, c'est à dire en résonance. Le terme transfert d'énergie résonant (RET pour Resonance Energy Transfer) est souvent employé.

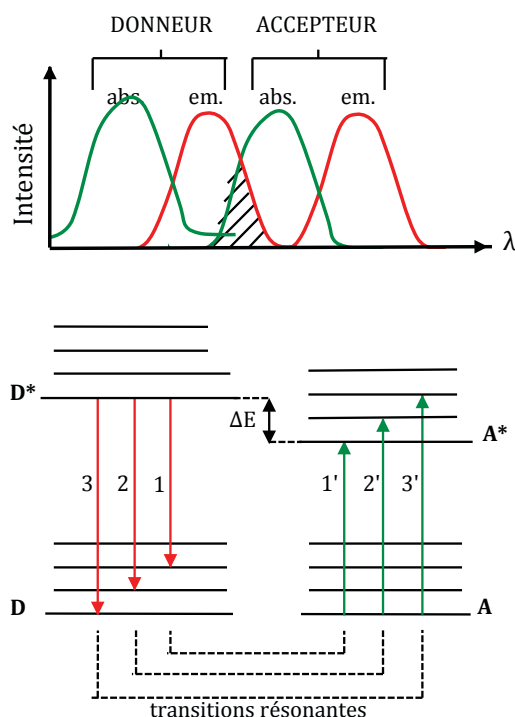


Figure 52. En haut : recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur. En bas : diagramme d'énergie montrant les transitions résonantes dans la zone de recouvrement spectral (zone hachurée).

On distingue deux mécanismes d'interaction pouvant être impliqués dans le transfert d'énergie non radiatif : les interactions coulombiennes à longue distance (mécanisme de type Förster) et les interactions impliquant un recouvrement d'orbitales moléculaires à

courte distance (mécanisme d'échange d'électron de type Dexter). Bien que le mécanisme d'échange de type Dexter soit prédominant à courte distance, il faut noter que le mécanisme coulombien reste tout de même effectif.

1.1.2.1 Mécanisme de Förster.

Le transfert d'énergie de type Förster (FRET pour Förster Resonance Energy Transfer) est un transfert dit coulombique, dominé par une interaction dipôle-dipôle sur de longues distances, pouvant atteindre 100 Å. Ces interactions perturbent les structures électroniques du donneur et de l'accepteur d'énergie. Elles sont transmises par le champ électromagnétique des molécules D^* et A , où l'oscillation du dipôle de transition en D^* induit une oscillation correspondante du dipôle de transition en A .¹⁸²

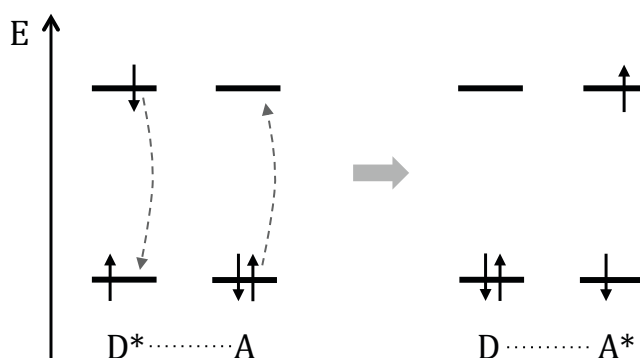


Figure 53 : mécanisme du transfert d'énergie de type Förster.

Plusieurs conditions influent sur l'efficacité (donc la vitesse) de cet échange, parmi lesquelles l'orientation relative des dipôles κ^2 , la distance séparant les dipôles (r), le recouvrement spectral entre le spectre d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur (J) ainsi que le temps de vie et le rendement quantique de fluorescence du donneur en l'absence d'accepteur (τ_F° et Φ_F° , respectivement)

La constante du transfert d'énergie (k_{ET}) est donnée par :¹⁷⁹

$$k_{ET} = \frac{8.8 \times 10^{-25} \kappa^2 \Phi_F^\circ}{n^4 r^6 \tau_F^\circ} \cdot J$$

où n représente l'indice moyen de réfraction du milieu dans la région de recouvrement spectral. J s'exprime en fonction du coefficient d'absorption molaire de l'accepteur $\epsilon_A(\lambda)$ et de l'intensité de fluorescence du donneur $F_D(\lambda)$:

$$J = \frac{\int F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda}$$

Le facteur d'orientation relative des dipôles κ^2 est donné par :

$$\begin{aligned}\kappa^2 &= (\cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \\ &= (\sin \theta_D \sin \theta_A \cos \varphi - 2 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2\end{aligned}$$

où θ_{DA} est l'angle entre les moments de transition du donneur, \mathbf{M}_D , et de l'accepteur, \mathbf{M}_A , θ_D et θ_A sont les angles que forment ces moments de transition avec le vecteur liant le donneur à l'accepteur ; φ est l'angle entre les projections des moments de transition sur un plan perpendiculaire à la ligne des centres (Figure 54). κ^2 peut en principe prendre des valeurs allant de 0 (moments de transition perpendiculaires) à 4 (moments de transition colinéaires). Quand les moments de transitions sont parallèles, $\kappa^2 = 1$.

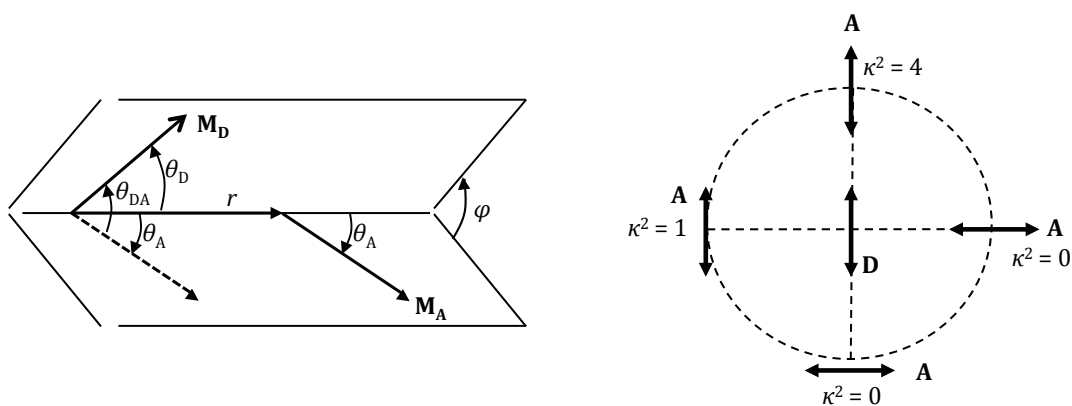


Figure 54 : paramètres structuraux impliqués dans la définition du facteur d'orientation κ^2 et exemples de valeurs.¹⁷⁹

Notons que lorsque les molécules tournent librement à une vitesse beaucoup plus grande que la vitesse de désactivation du donneur, une valeur de $\kappa^2 = 2/3$ correspondant à la moyenne dynamique isotrope est généralement utilisée.

1.1.2.2 Mécanisme de Dexter

Ce mécanisme de transfert d'énergie met en jeu un échange d'électron entre D^* et A. Il nécessite une distance entre les deux chromophores suffisamment courte (environ 10 Å) pour permettre un recouvrement spatial des orbitales responsables de l'échange. D^* transfère un électron vers le LUMO de A et A transfère simultanément un électron de son HOMO vers l'orbitale correspondante de D.¹⁸³ On peut considérer qu'à courte distance (en dessous de 10 Å), le mécanisme d'échange d'électrons de type Dexter devient prépondérant vis-à-vis de celui de type Förster. Néanmoins, ce dernier reste actif, même à courte distance. On admet usuellement qu'en dessous de $R = 10$ Å, le mécanisme de type Dexter devient prépondérant.

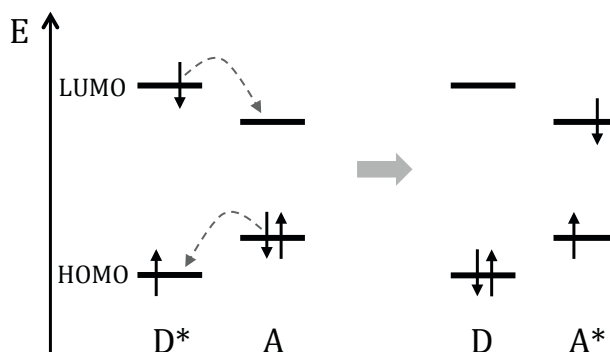


Figure 55 : mécanisme du transfert d'énergie de type Dexter.

1.2 Applications

Les systèmes multichromophoriques sont capables de former des assemblages supramoléculaires photoactifs très diversifiés et dotés de propriétés photophysiques multiples dont le transfert d'énergie intermoléculaire. Cette propriété est notamment utilisée pour l'étude des interactions protéines-protéines aussi bien à l'intérieur de la cellule qu'à la surface cellulaire.¹⁸⁴ Dans le domaine des récepteurs couplés aux protéines G par exemple, ces approches ont révélé l'existence de récepteurs membranaires homo- ou hétérodimériques et ont contribué à mieux comprendre les mécanismes intervenant au cours de l'activation des protéines G.¹⁸⁵ Elles ont aussi permis de développer des sondes sensibles à d'autres molécules biologiques, comme par exemple la GFP (Green Fluorescent Protein)¹⁸⁶ ou l'ADN.¹⁸⁷ Quelle que soit la méthode choisie, cette démonstration repose sur la détection d'un signal caractéristique reflétant la forte proximité, si ce n'est l'association, de différents chromophores et permet la détermination spatiale de distance ou de configuration de structures au sein d'édifices supramoléculaires. Pour ce genre d'étude, on doit pouvoir observer la fluorescence de l'accepteur, mais aussi la fluorescence résiduelle du donneur. Le transfert d'énergie ne doit donc pas être trop efficace, au point de désactiver complètement la fluorescence du donneur.

La compréhension du phénomène de transfert d'énergie intermoléculaire est capitale pour améliorer la précision des méthodes bioanalytiques. Elle passe notamment par le développement et l'étude de systèmes multichromophoriques. Ces composés, que l'on peut également qualifier de cassettes à transfert d'énergie, possèdent de larges domaines d'absorption, et un grand écart spectral entre l'absorption du donneur et la fluorescence de l'accepteur. Ces propriétés spectrales uniques permettent leur application dans d'autres domaines que la biotechnologie. Ils font notamment l'objet de nombreux développements de dispositifs photovoltaïques organiques, nécessitant une

absorption sur une large gamme de longueur d'onde. Pour ces systèmes, un transfert d'énergie efficace, donc rapide est privilégié.

Les caractéristiques photophysiques des BODIPY (forte absorption, rendements quantiques de fluorescence élevés, domaine d'absorption/émission modulable dans la zone visible et proche infra-rouge) en font de bons candidats pour l'élaboration de systèmes multichromophoriques.¹⁷⁷ La Figure 56 l'illustre parfaitement : ce composé développé par le groupe de Ziessel, et combinant trois types de BODIPY (distyryle, monostyryle et sans styryle), possède une forte absorption entre 300 et 650 nm¹⁸⁸. En excitant le système à 480 nm (zone d'absorption du BODIPY sans styryle) une émission provenant des BODIPY mono- et distyryle est observée, avec un rendement quantique de fluorescence de 47 %.

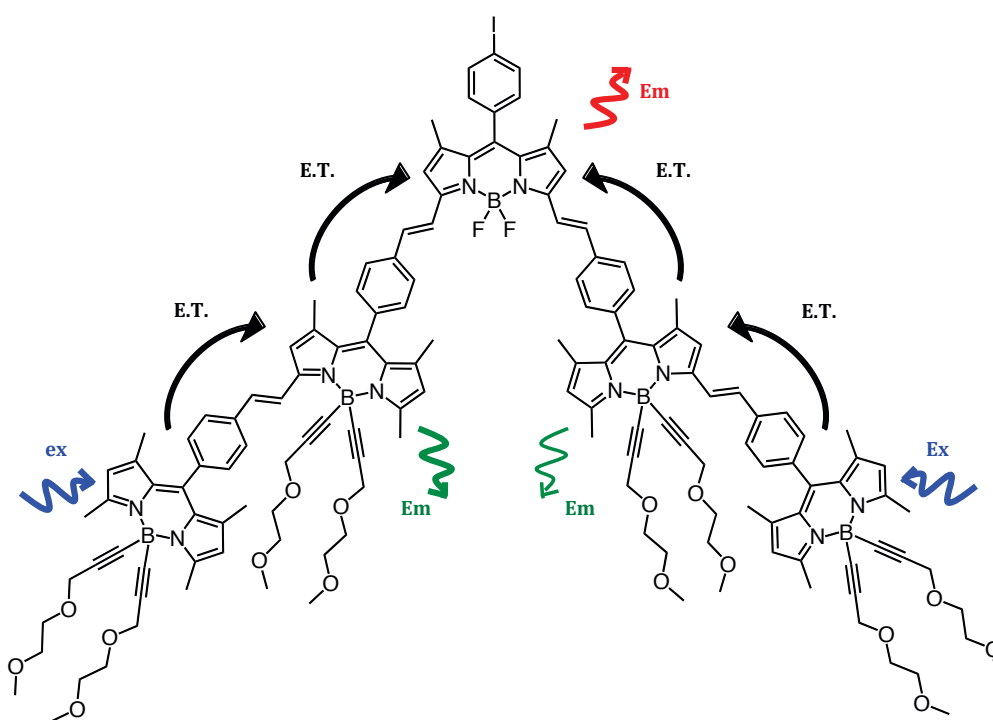


Figure 56 : système multichromophorique de transferts singulet-singulet en cascade à base de BODIPY élaboré par Bura et al.¹⁸⁸ (E.T. =Energy Transfer, Em = Emission, Ex = Excitation)

Objectifs des travaux de thèse :

Dans ces travaux de thèse, nous cherchons à valoriser différents BODIPY décrits dans le chapitre II pour la synthèse de nouveaux systèmes d'antennes multichromophoriques à base de BODIPY. Dans l'article III, la méthode de *O*-fonctionnalisation décrite dans le chapitre II.1 est mise en oeuvre pour la synthèse de *O*-BODIPY-bisporphyrine. L'article IV est consacré à l'élaboration de plusieurs systèmes BODIPY-corrole de gallium, à partir de précurseurs décrits dans le chapitre II.2. En modulant la structure du BODIPY dans ces systèmes d'antenne, le corrole de gallium(III) est alternativement donneur ou accepteur d'énergie.

Les études photophysiques des différents composés synthétisés sont également présentées dans ces deux articles. Les constantes de vitesse de transfert d'énergie de chaque système d'antenne seront calculées, et des corrélations entre les valeurs théoriques et les valeurs expérimentales obtenues par la théorie de Förster seront également discutées.

2 Triades O-BODIPY-bisporphyrine : caractérisation de l'effet d'antenne

2.1 Introduction

La formation de liaisons B-C a notamment été utilisée par le groupe de Ziessel pour l'introduction de carbocycle sur des BODIPY, comme nous l'avons montré dans le chapitre II.111. D'autres systèmes d'antennes plus élaborés ont également été obtenus par cette approche, comme le montre la Figure 57. Un système arylBODIPY-bisBODIPY a notamment été obtenu, et l'influence de la longueur de l'espaceur porté par l'atome de bore sur la vitesse de transfert d'énergie a été étudiée. Les constantes de vitesse pour les différents systèmes obtenus varient de 4,90 ($n = 0$) à 1,15 ns⁻¹ ($n = 3$).¹⁷⁸ Un système analogue ($n = 0$) dans lequel chacun des deux BODIPY est à son tour fonctionnalisé par deux groupements pyrènes a également été décrit. Dans ce cas, les quatre groupements pyrènes permettent d'augmenter fortement l'absorption du système dans la région UV.

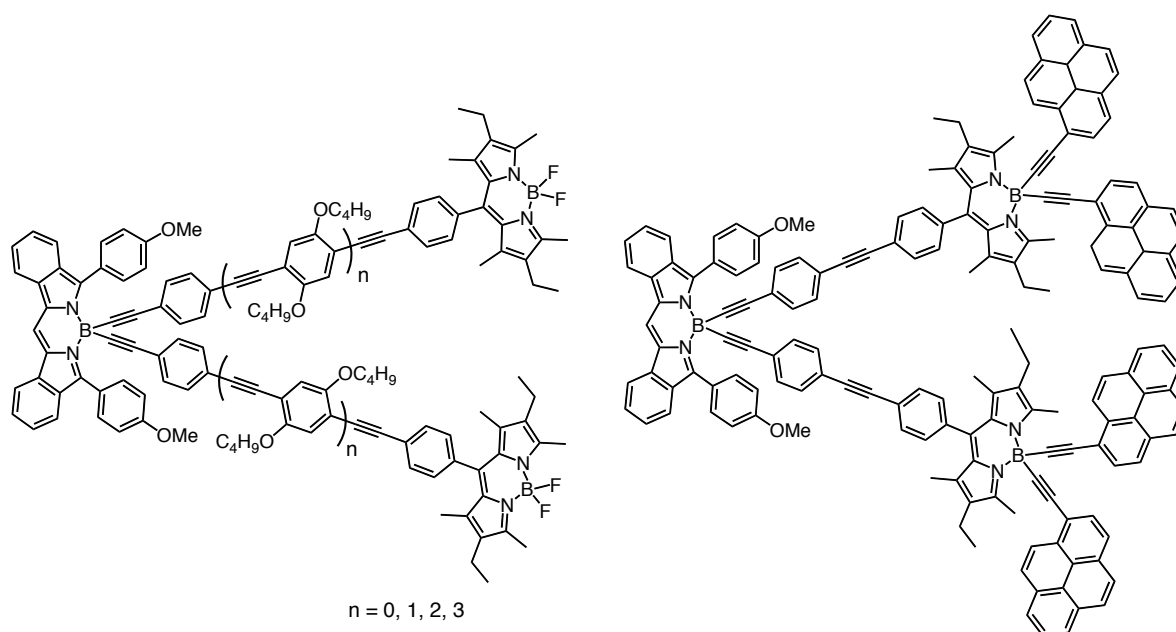


Figure 57 : systèmes élaborés par Harriman *et al.*¹⁷⁸

A notre connaissance, les seuls travaux décrivant un système d'antenne à base de O-BODIPY ont été réalisés par le groupe de D'Souza.¹⁴⁵ Différents carbocycles jouant le

rôle d'antenne ont été greffés sur la position *meso* d'un *O*-BODIPY fonctionnalisé par un dérivé du fullerène C_{60} (accepteur d'électron). Les études photophysiques de ces systèmes montrent qu'une excitation du carbocycle provoque dans la plupart des cas un transfert d'énergie vers le BODIPY. Le BODIPY se désactive ensuite depuis son état S_1 en transmettant un électron au fullerène.

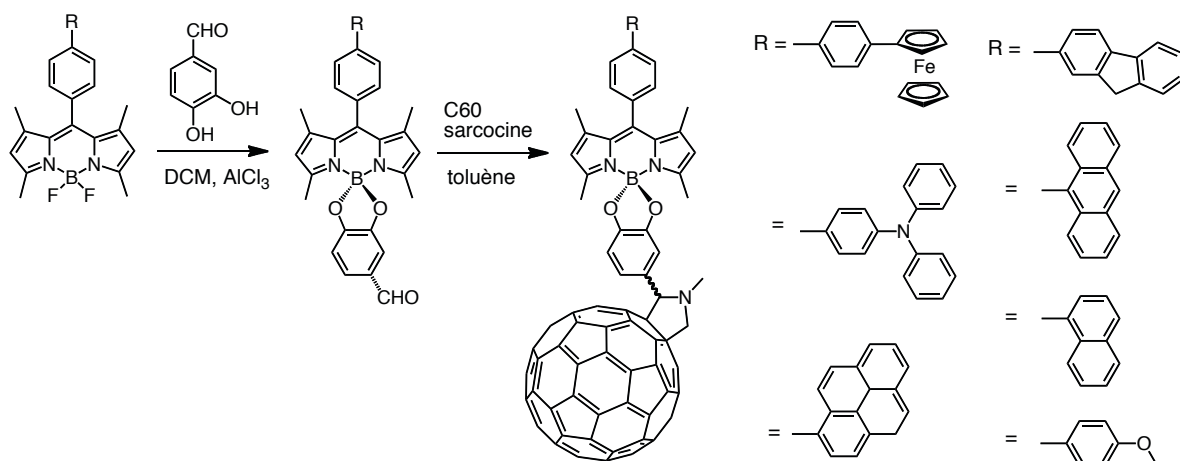
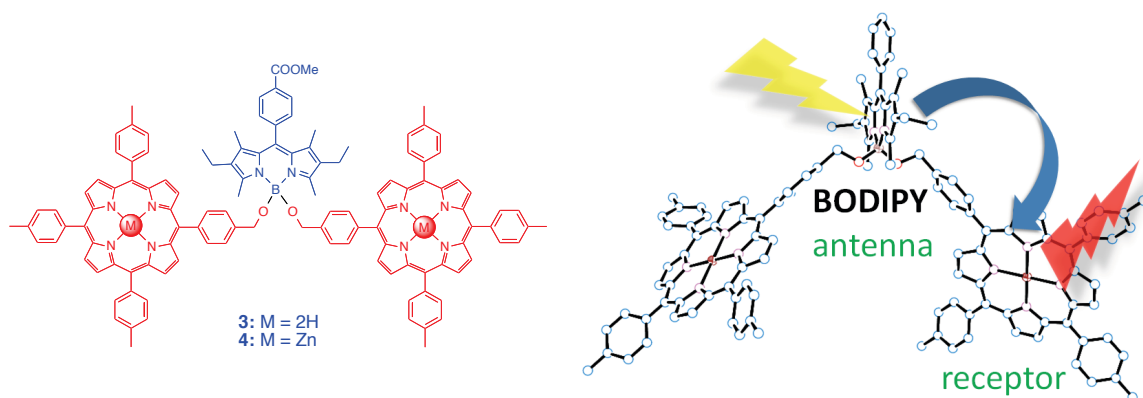


Figure 58 : *O*-BODIPY élaborés par le groupe de D'Souza.¹⁴⁵

Dans l'article III, nous rapportons deux nouveaux systèmes *O*-BODIPY-bisporphyrine- H_2 et *O*-BODIPY-bisporphyrine-Zn pour lesquels une excitation du BODIPY entraîne un transfert d'énergie du BODIPY vers la porphyrine. Les propriétés spectrales des différents composés sont présentées, ainsi que les calculs de vitesse de transfert d'énergie dans les deux systèmes d'antenne

2.2 Article III

Résumé de l'article III



Deux systèmes O-BODIPY-bisporphyrine ont été synthétisés et leurs propriétés photophysiques ont été analysées. Pour ces deux composés, un transfert d'énergie singulet-singulet du BODIPY vers la porphyrine a été mis en évidence.

B,B-diporphyrinbenzyloxy-BODIPY dyes: Synthesis and Antenna Effect

Bertrand Brizet,^{a,b} Antoine Eggenpillier,^a Claude P. Gros,^{a,*} Jean-Michel Barbe,^a Christine Goze,^a Franck Denat^a and Pierre D. Harvey^{b,*}

[a] *Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, Université de Bourgogne, France.*

[b] *Département de Chimie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.*

Published in *Journal of Organic Chemistry*, **2012**, 77, 3646-3650.

Abstract. B,B-diporphyrinbenzyloxy-BODIPY derivatives have been prepared in high yields and the photophysical properties are reported. Singlet energy transfers from BODIPY to the porphyrin units have been analyzed.

The B-F bonds of BODIPY are convenient functions for the design of light harvesting devices based on this dye. Despite numerous efforts, there are only few examples reported so far including the 4,4-dialkoxy or 4,4-diaryloxy-diaza-*S*-indacene(BODIPY)-containing antennas.^{1u,2} In this respect, some *B*-methoxy (*B*-OMe) BODIPY were successfully prepared by reacting the corresponding BF₂ compound with sodium methoxide in methanol.^{2a} The absorption and emission spectra of the corresponding alkoxy products reveal no change compared to the BODIPY itself, indicating that the introduction of substituents on the B-atom had little effect on the electronic states of the borindacene core.^{2a} *B*-OR BODIPY systems have also been obtained *via* the treatment of the corresponding BODIPY with various alcohols in the presence of aluminum trichloride.^{2b} Furthermore, a difluoro-boron dipyrin was subsequently converted into dioxyboron dipyrin derivatives by treatment with dihydroxy benzaldehyde in the presence of aluminum trichloride and provided access to donor–acceptor–acceptor and antenna–donor–acceptor type triads.^{1u} We now wish to report here the synthesis and characterization of B,B-diporphyrinbenzyloxy-BODIPY derivatives (Chart 1). Evidence for singlet energy transfer from BODIPY to the porphyrin unit is provided.

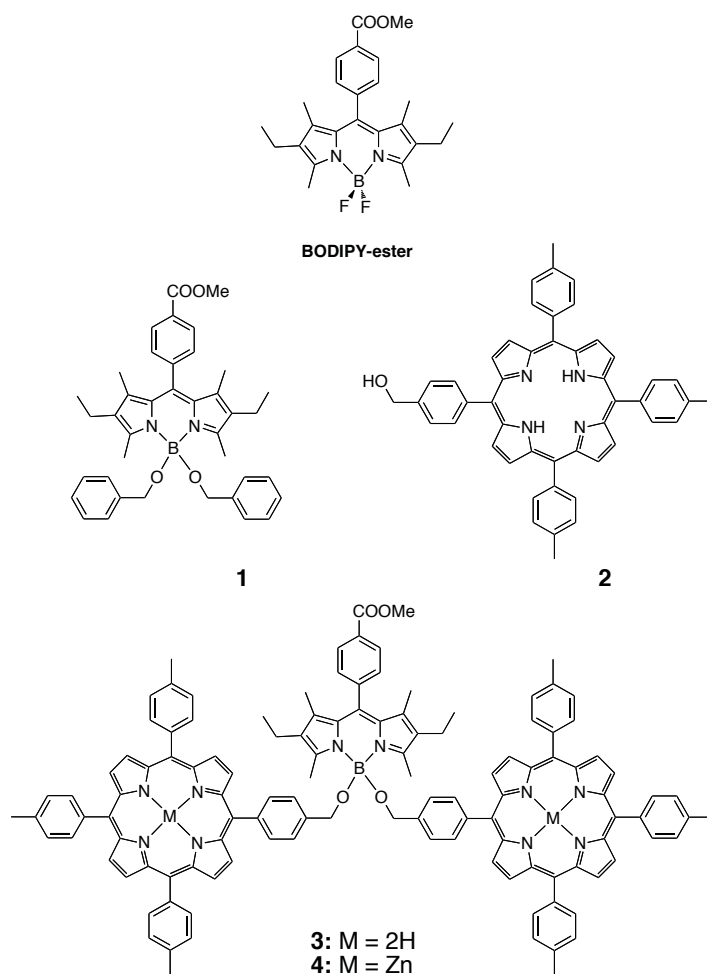


Chart 1

The target model compound **1** and the dyad system **3** were readily obtained in only one step from benzyl alcohol and porphyrin **2** (obtained by reduction of 5-(4-(carboxy)phenyl)-10,15,20-tritolylporphyrin zinc)) in 61 and 86% yield, respectively (Scheme 1). The zinc insertion into the free base **3** followed by purification by column chromatography over silica with dichloromethane as the solvent gave the diporphyrin biszinc complex **4** in an almost quantitative yield. The experimental conditions and spectroscopic data for **1**, **2**, **3** and **4** are provided in the Supporting Information (SI, Experimental Section). The HR-MS data of **3** and **4** reveal the presence of only one ion attributed to the mono-sodium adduct. In both cases, the perfect match between experimental and simulated ionic patterns undoubtedly confirms the structure of **3** and **4** (see SI). For example, the calculated mass for the mono-sodium adduct of **4** ($C_{121}H_{99}BN_{10}NaO_4Zn_2$) is equal to 1917.6436 Daltons, in agreement with the experimental value found at 1917.6396 Daltons ($[M+Na]^+$).

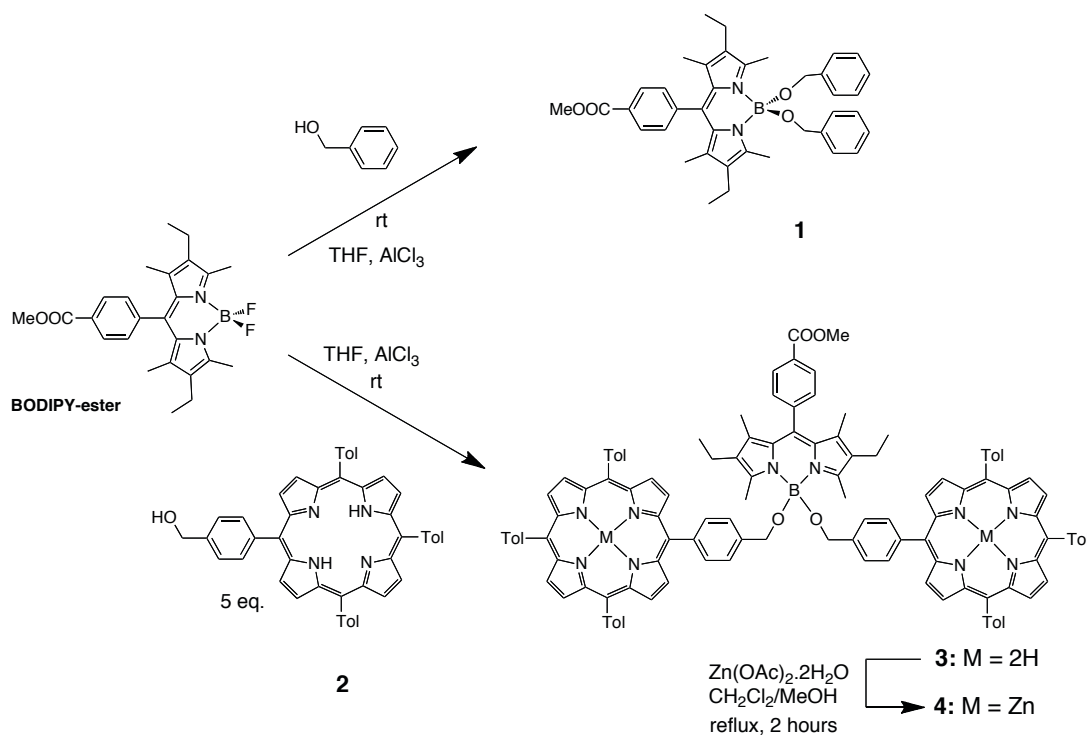


Table 1 summarizes the UV-vis data for all compounds in THF. Compound **1** exhibits two bands characteristic of BODIPY; the S_0-S_1 band at 526 and the S_0-S_2 band at 382 nm, both assigned to spin-allowed $\pi-\pi^*$ transitions. The UV-vis spectrum of the free base porphyrin **2** and Zn(TPP) (TPP= 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin) are characterized by one Soret band, two Q bands for Zn(TPP) and five Q bands for **2**. It appears that absorption spectra of the multichromophoric species **3** and **4** correspond to the sum of the

absorption spectra of the individual components, **1** and **2** for compound **3**, and **1** and **Zn(TPP)** for compound **4** (Figures S6 and S7) indicating that the interchromophoric interactions are minimal. The positions of the absorption spectra of compound **1** and **Zn(TPP)** indicate that BODIPY and the porphyrin units are the S_1 energy donor and acceptor, respectively.

Table 1. UV-Vis Absorption Data in THF at 298K

Compound	λ_{\max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)			
	Porphyrin chromophore		BODIPY chromophore	
	Soret band	Q Bands	S_2 Band	S_1 Band
1	-	-	382 (3.3)	526 (32.5)
2	417 (312)	649 (3.4) 593 (4.1) 550 (7.5) 515 (14.0) 484 (3.2)	-	-
3	418 (816)	648 (8.6) 592 (10.3) 546 (27.8)	-	526 (69.1)
4	423 (104)	559 (36.7) 598 (15.9)		528 (60.0)
Zn(TPP)	423 (606)	594 (7.1) 555 (21.7)		

The photophysical data are summarized in Table 2. One example of the fluorescence spectra is provided in Figure 1. BODIPY **1** shows an intense fluorescence at 544 nm with a quantum yield, Φ_F , of 0.62 and a lifetime, τ_F , of 3.7 ns. The emission spectra of the porphyrin subunits exhibit two characteristic bands respectively at 653 nm and 718 nm for compound **2** ($\tau_F = 11.0$ ns), and 605 nm and 655 nm for Zn(TPP) ($\tau_F = 1.9$ ns).

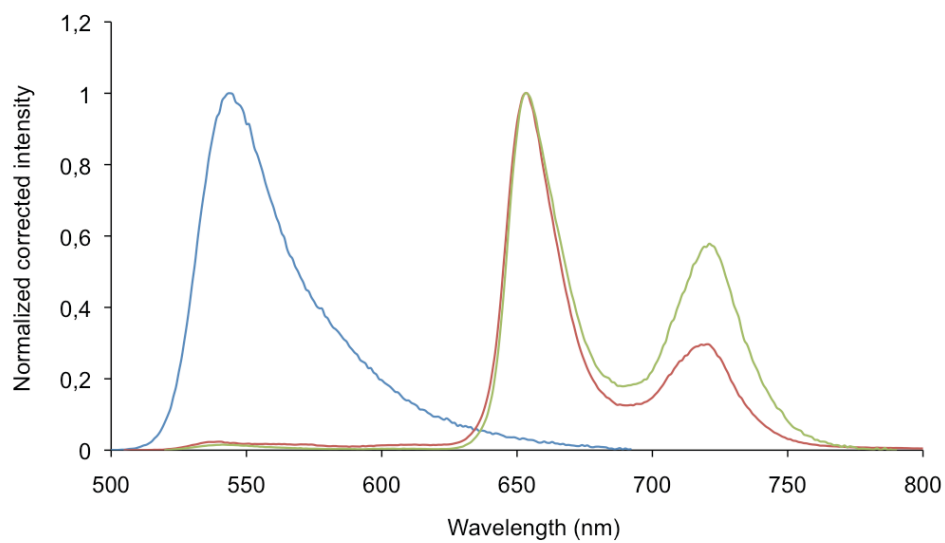


Figure 1: Emission spectra of compounds **2** (red, $\lambda_{\text{exc}} = 500$ nm), **3** (green) and **1** (blue, $\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm) in 2-MeTHF, at 298K.

Table 2. Fluorescence lifetimes, τ_F , in 2-MeTHF at 298K and 77K

2-MeTHF								
298K								
77K								
Compound	Φ_F^a 298K	λ_{em} (nm)	λ_{exc} (nm)	τ_F (ns)	k_{ET} (s ⁻¹)	λ_{exc} (nm)	τ_F (ns)	k_{ET} (s ⁻¹)
1	0.62	544	530	3.7	-	530	8.1	-
2	0.089	653, 718	548	11.0	-	548	13.6	-
3	0.068 ^b	653	530 590	^c 12.6	^c	530 590	4.5 14.5	1 x 10 ⁸
4	0.039 ^b	655	530 560	3.3 1.9	3 x 10 ⁷	530 560	4.6 2.3	1 x 10 ⁸
Zn(TPP)	0.037	605, 655	563	1.9	-	563	2.6	-

^aQuantum yields were measured in 2-MeTHF at 298K, using Rhodamine 6G as reference³ ($\Phi_F = 0.94$ in MeOH, $\lambda_{exc} = 488$ nm). All Φ_F are corrected for changes in refractive index. ^bTotal quantum yield (BODIPY and porphyrins). ^cNot measured.

When dyad **3** is irradiated at 530 nm where the BODIPY chromophore absorbs the most, almost exclusively the fluorescence of the porphyrin unit is observed. The excitation spectrum exhibits a perfect match with the absorption (Figure 2 and SI). These two properties indicate clearly an efficient S_1 energy transfer from BODIPY to porphyrin, following excitation of the BODIPY subunit.

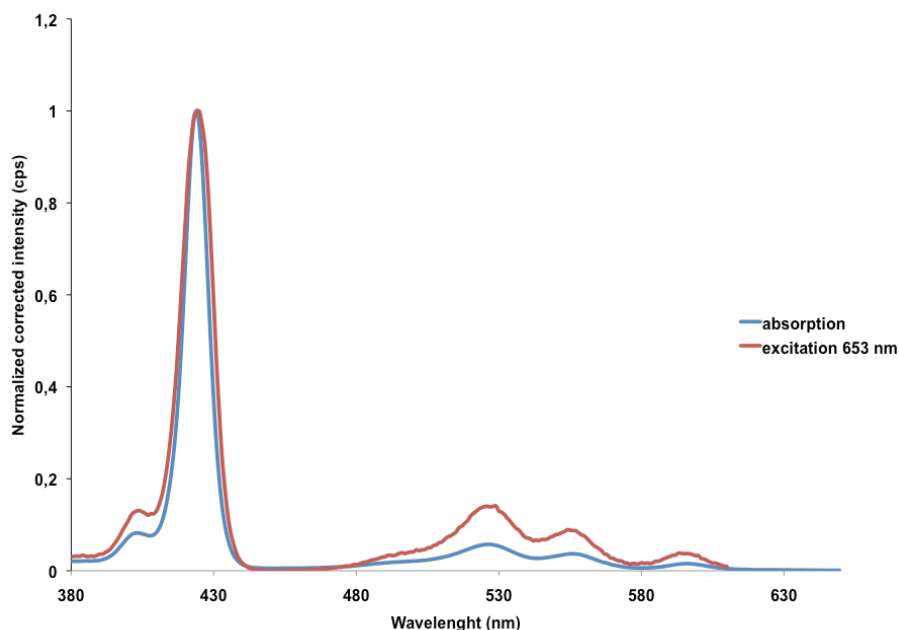


Figure 2: Absorption and excitation spectra of compound **4** ($\lambda_{exc} = 653$ nm)

The τ_F data were used to extract the S_1 energy transfer rates, k_{ET} . Again, compounds **3** and **4** exhibit two fluorophores, BODIPY and porphyrins (as a free base or a zinc(II) complex), again assigned as the S_1 energy donor and acceptor, respectively. The Φ_F data of the acceptor remain relatively the same regardless the presence or the absence of the S_1 energy donor at 298 and 77K. This observation indicates that the anchoring of the porphyrin unit onto BODIPY does not increase the rates for the non-radiative processes internal conversion, k_{ic} , and intersystem crossing, k_{isc} . On the other hand, a decrease in τ_F of the donor is noted, particularly at 77K (by \sim a factor of 2). Using the equation $k_{ET} = 1/\tau_{F(donor)} - 1/\tau_{F^o(donor)}$ where τ_F and τ_{F^o} are the fluorescence lifetimes of the donor in the presence and absence of acceptor, respectively, then the approximated k_{ET} is $\sim 1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ for both **3** and **4**. Despite the obvious decrease in total Φ_F (going from 0.62 for **1** to 0.068 and 0.039 for **3** and **4**, respectively, at 298K), the through space energy transfer rates of $1 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ are considered modest with respect to other dyads ($\sim 10^9 - 10^{10} \text{ s}^{-1}$). The reason for this is most likely due to the non-parallel orientation of the transition moments between the donor and the acceptor according to a Förster mechanism⁶ (see the graphical abstract which corresponds to a minimized geometry of **4**; PC Model). In line with a

Förster mechanism,⁶ the fact that the k_{ET} data is strongly temperature dependent ($k_{ET} \sim 3 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ at 298 K) is consistent with this explanation where a relative change in conformation occurs *via* the rotation about the B-O and O-C single bonds upon changing the temperature.

In conclusion, the good spectral overlap between the donor fluorescence (BODIPY) and acceptor absorption (porphyrin) leading to a notable quenching of the former is observed and clearly demonstrates the BODIPY dye as a good chromophore for the antenna effect. However, the current dyad design can be improved from a gain in appropriate relative orientation of the transition moments between the donor and acceptor.

Experimental section

Instrumentation. ^1H NMR spectra were recorded on a 300 MHz spectrometer at the “*Pôle Chimie Moléculaire (Université de Bourgogne)*”; chemical shifts are expressed in ppm relative to chloroform. ^{13}C NMR spectra were recorded on a 300 MHz spectrometer at the “*Université de Sherbrooke*”. Mass spectra were obtained in the MALDI/TOF reflectron mode using dithranol as a matrix or by ESI on an Orbitrap spectrometer. The measurements were made at the “*Pôle Chimie Moléculaire (Université de Bourgogne)*”. UV-vis spectra were recorded on a diode array apparatus. Emission and excitation spectra were obtained using a double monochromator instrument. Fluorescence and phosphorescence lifetimes were measured on a apparatus incorporating a nitrogen laser as the source and a high-resolution dye laser (fwhm = 1.4 ns). Fluorescence lifetimes were obtained from high-quality decays and deconvolution or distribution lifetime analysis. The uncertainties ranged from 20 to 40 ps on the basis of multiple measurements. Phosphorescence lifetimes were determined using an apparatus incorporating a 1 μs tungsten flash lamp (fwhm $\sim 1 \mu\text{s}$). Flash photolysis spectra and transient lifetimes were measured using the 355 nm line of a YAG laser from Continuum (Serulite; fwhm = 13 ns).

Quantum Yield Measurements. For measurements at 298 K, all samples were prepared in a glovebox, under argon ($\text{O}_2 < 12 \text{ ppm}$), by dissolution of the compounds in 2-MeTHF, using 1 cm^3 quartz cells with a septum. Three different measurements (*i.e.*, different solutions) were performed for each set of photophysical data (quantum yield). The sample concentrations were chosen to correspond to an absorbance of ~ 0.05 at the excitation wavelength. Each absorbance value was measured three times for better accuracy in the measurements of emission quantum yields. Tetraphenylporphyrin (0.10 in THF)⁷ or tetraphenylporphyrin zinc(II) (0.033 in THF) were used as reference.⁸

Chemicals and Reagents. Unless otherwise noted, all chemicals and solvents were of analytical reagent grade and used as received. Silica gel (70-120 μm) was used for column chromatography. Analytical thin-layer chromatography was performed with 60 F₂₅₄ silica

gel (precoated sheets, 0.2 mm thick). Reactions were monitored by thin-layer chromatography, UV/Vis spectroscopy and MALDI/TOF mass spectrometry.

5-(4-(Carboxy)phenyl)-10,15,20-tritolylporphyrin Zinc(II). To a solution of 4-carboxybenzaldehyde (2.20 g, 14.6 mmol) in 250 mL of CHCl_3 were added 4.56 g (19.3 mmol) of 5-*para*-tolylidipyrromethane and 590.0 mg (5.0 mmol) of 4-methylbenzaldehyde. The solution was degassed under nitrogen bubbling for 15 min, shielded from light. Boron difluoride diethyletherate (325 μL , 2.5 mmol) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h 30 min. *p*-Chloranil (2.40 g, 9.7 mmol) was then added under stirring. After 2 hours, the solvent was evaporated under reduced pressure. The residue thus obtained was chromatographed on silica gel using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (100/5) and the first purple fraction was isolated. After evaporation of the solvent under vacuum, the residue was re-dissolved in 250 mL of chloroform and the solution was treated with 100 mL of a methanolic solution of $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.40 g, 30.0 mmol) in the presence of sodium acetate (2.40 g, 30.0 mmol). The mixture was heated at 75°C , the reaction was monitored by TLC, UV-visible and MALDI/TOF mass spectrometry. After 2 hours and cooling to room temperature, the reaction mixture was washed three times with water (750 mL), then dried over magnesium sulphate and concentrated. The residue obtained was chromatographed on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100/5). The red-pink fraction was isolated, and the solvent was removed under reduced pressure to give the title compound in 27% yield (2.00 g, 2.67 mmol). $\text{Mp} > 300^\circ\text{C}$. UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 422.0 (135), 551.0 (6), 588.0 (3). ^1H NMR (CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 2.61 (s, 9H), 7.54 (d, $J = 7.8 \text{ Hz}$, 6H), 8.08 (d, $J = 7.8 \text{ Hz}$, 6H), 8.32 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H), 8.47 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H), 8.91 (m, 8H). MS (MALDI-TOF): $m/z = 762.18 [\text{M}]^+$, 762.19 calcd. for $\text{C}_{48}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_2\text{Zn}$.

B,B-Bisbenzoyl-1,3,7,9-tetramethyl-2,8-diethyl-5-(*para*-methylbenzoyl)-BODIPY

(1). To a solution of BODIPY ester (70.0 mg, 160 μmol) in dry CH_2Cl_2 (25 mL) was added, under nitrogen, aluminium trichloride (175.0 mg, 1.31 mmol). The solution was heated to 40°C for 30 min (the color of the solution turned from pale-orange to red) then cooled to room temperature. Benzyl alcohol (85 μL , 820 μmol) was then added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. After filtration over alumina in order to remove AlCl_3 , all the volatiles were evaporated under reduced pressure. After purification by chromatography on silica (EtOAc), the title compound was isolated as a red oil in 61% yield (60.0 mg, 97 μmol). UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 418.0 (880), 525.0 (77), 592.0 (10), 649.0 (10). ^1H NMR (CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 0.87 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 6H), 1.17 (s, 6H), 2.15 (q, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 4H), 2.42 (s, 6H), 4.02 (s, 3H), 4.49 (s, 4H), 7.15 (m, 10H), 7.40 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 8.13 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K): δ (ppm) = 11.9, 12.7, 14.7, 17.1, 29.7, 30.2, 31.4, 52.4, 64.5, 124.5, 126.3, 127.5, 127.7, 129.0, 130.2, 136.2, 141.5, 154.9. HR-MS (ESI): $m/z = 637.3178 [\text{M}+\text{Na}]^+$, 637.3214 calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{43}\text{BNa}_2\text{O}_4$.

5-(4-(Hydroxymethyl)phenyl)-10,15,20-tritolylporphyrin (2). To a suspension of LiAlH_4 (75.0 mg, 1.97 mmol) in dry tetrahydrofuran (35 mL) was added dropwise at -80°C a solution of 5-(4-(carboxy)phenyl)-10,15,20-tritolylporphyrin zinc (500.0 mg, 0.65 mmol) in dry tetrahydrofuran (35 mL). The mixture was stirred at -80°C for 10 min, warmed to room temperature for 1 hour, then quenched with water (5 mL). After evaporation of the solvent in vacuum, the residue was extracted with CHCl_3 , washed three times with water (10 mL), dried over magnesium sulphate then filtered and evaporated. The residue obtained was chromatographed on silica ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 100/2). The fractions were collected and the solvent was evaporated under reduced pressure. The solid was dissolved in CH_2Cl_2 (100 mL) and 2.0 mL of trifluoroacetic acid were added dropwise under stirring. After 2 hours, the reaction mixture was washed with saturated hydrogen carbonate solution, two times with water (100 mL), then dried over magnesium sulphate. After all volatiles were removed under reduced pressure, the title compound **2** was isolated in 57% yield (254.0 mg, 0.37 mmol) as a purple powder. $\text{Mp} > 300^\circ\text{C}$. UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 416.0 (330), 514.0 (13), 550.0 (8), 590.0 (4), 646.0 (3). ^1H NMR (pyridine- D_5 , 298 K): δ (ppm) = -2.27 (s, 2H), 2.61 (s, 9H), 5.36 (s, 2H), 7.60 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$), 8.07 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 2H), 8.27 (d, $J = 7.6 \text{ Hz}$, 6H), 8.47 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 2H), 9.14 (m, 8H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K): δ (ppm) = 14.1, 21.5, 29.7, 30.3, 65.4, 120.2, 125.3, 127.4, 131.0, 134.5, 137.3, 139.3. MS (MALDI-TOF): $m/z = 686.3122 [\text{M}]^+$, 686.3040 calcd. for $\text{C}_{48}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}$.

B,B-Bis(1-benzyloxy-10,15,20-tritolylporphyrinyl)-1,3,7,9-tetramethyl-2,8-diethyl-5-(para-methylbenzoyl)-BODIPY (3). To a solution of BODIPY ester (23.0 mg, 52 μmol) in dry THF (50 mL) was added, under nitrogen, aluminium trichloride (55.0 mg, 412 μmol). The solution was heated to 40°C for 30 min (the color of the solution turned from pale-orange to red) then cooled to room temperature. 5-(4-(Hydroxymethyl)phenyl)-10,15,20-tritolylporphyrin **2** (170.0 mg, 250 μmol) was then added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h 30 min. After filtration over alumina in order to remove AlCl_3 , all the volatiles were evaporated under reduced pressure. After purification by chromatography on silica (EtOAc/heptane , 30/70), the compound was crystallized in a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{heptane}$ mixture to afford the title compound **3** as a purple solid in 84% yield (78.0 mg, 44 μmol). $\text{Mp} > 300^\circ\text{C}$. UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 418.0 (880), 525.0 (77), 592.0 (10), 649.0 (10). ^1H NMR (CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = -2.77 (s, 4H), 1.05 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 6H), 1.42 (s, 6H), 2.42 (q, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 4H), 2.68 (s, 18H), 2.88 (s, 6H), 3.98 (s, 3H), 4.57 (s, 4H), 7.54 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 12H), 7.64 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 7.67 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 4H), 8.08 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 12H), 8.10 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 4H), 8.24 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 8.83 (s, 16H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K): δ (ppm) = 12.1, 13.2, 14.9, 17.3, 21.5, 29.7, 52.4, 64.8, 120.0, 120.3, 126.2, 127.4, 129.1, 130.3, 130.9, 131.8, 133.3, 134.3, 134.5, 155.1. HR-MS (ESI): $m/z = 886.4219 [\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, 886.4209 calcd. for $\text{C}_{121}\text{H}_{103}\text{BN}_{10}\text{O}_4$.

B,B-Bis(zinc(II)-1-benzyloxy-10,15,20-tritolylporphyrinyl)-1,3,7,9-tetramethyl-2,8-diethyl-5-(*para*-methylbenzoyl)-BODIPY (4). To a solution of BODIPY-diporphyrin **3** (50.0 mg, 28 μmol) in 10 mL of CH_2Cl_2 was added a methanolic solution of $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (24.0 mg, 109 μmol) and sodium acetate (20.0 mg, 243 μmol) and the mixture was heated under reflux for 2 hours. The reaction was monitored by TLC, UV-visible and MALDI/TOF mass spectrometry. After cooling to room temperature, the reaction mixture was washed three times with water (10 mL), dried over magnesium sulphate and filtered. The title compound **4** was obtained in almost quantitative yield as a purple solid (53.0 mg, 28 μmol) after re-crystallization in a CH_2Cl_2 /heptane mixture. Mp > 300 °C. UV/Vis (CH_2Cl_2): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 422.0 (810), 529.0 (56), 590.0 (6). ^1H NMR (CDCl_3 , 298 K): δ (ppm) = 1.07 (t, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 6H), 1.44 (s, 6H), 2.44 (q, $J = 7.4 \text{ Hz}$, 4H), 2.69 (s, 18H), 2.90 (s, 6H), 3.97 (s, 3H), 4.58 (s, 4H), 7.54 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 12H), 7.64 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 7.67 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 4H), 8.09 (d, $J = 7.9 \text{ Hz}$, 12H), 8.11 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 4H), 8.23 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 8.94 (s, 16H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K): δ (ppm) = 12.1, 13.2, 14.9, 17.3, 21.5, 29.7, 52.4, 64.8, 121.1, 126.1, 127.3, 129.1, 131.8, 134.1, 137.0, 139.9, 140.1, 150.3. MS (MALDI-TOF): $m/z = 1895.28$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1895.66 calcd. for $\text{C}_{121}\text{H}_{100}\text{BN}_{10}\text{O}_4\text{Zn}_2$. HR-MS (ESI): $m/z = 1917.6396$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1917.6436 calcd. for $\text{C}_{121}\text{H}_{99}\text{BN}_{10}\text{NaO}_4\text{Zn}_2$.

Note

Supporting Information: ^1H , ^{13}C NMR spectra and mass spectra (HR-MS) of compounds **1-4** (Figures S1-S12). Absorption spectra of **1**, ZnTPP and **4** in Me-THF, at 298K (Figure S13). Absorption spectra of **1**, **2** and **3** in Me-THF, at 298K (Figure S14). Emission spectra of **4**, **1**, and ZnTPP in Me-THF, at 298K (Figure S15). Emission spectra of **2**, **3** and **1** in Me-THF, at 298K (Figure S16).

Acknowledgment

The “*Centre National de la Recherche Scientifique*” (ICMUB, UMR CNRS 6302) is gratefully thanked for financial support. Support was provided by the CNRS, the “*Université de Bourgogne*” and the “*Conseil Régional de Bourgogne*” through the 3MIM integrated project (“*Marquage de Molécules par les Métaux pour l’Imagerie Médicale*”). PDH thanks the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for financial support. We are thankful to Normand Pothier for the registration of ^{13}C NMR spectra.

References

1. (a) Bozdemir, O. A.; Guliyev, R.; Buyukcakil, O.; Selcuk, S.; Kolenen, S.; Gulseren, G.; Nalbantoglu, T.; Boyaci, H.; Akkaya, E. U., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**,

- 132, 8029-8036; (b) Barin, G.; Yilmaz, M. D.; Akkaya, E. U., *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1738-1740; (c) Benstead, M.; Mehl, G. H.; Boyle, R. W., *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3573-3601; (d) Coskun, A.; Akkaya, E. U., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10464-10465; (e) Coskun, A.; Deniz, E.; Akkaya, E. U., *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5359-5361; (f) D'Souza, F.; Smith, P. M.; Zandler, M. E.; McCarty, A. L.; Itou, M.; Araki, Y.; Ito, O., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7898-7907; (g) Dost, Z.; Atilgan, S.; Akkaya, E. U., *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8484-8488; (h) Gu, Z. Y.; Guo, D. S.; Sun, M.; Liu, Y., *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3600-3607; (i) Holten, D.; Bocian, D. F.; Lindsey, J. S., *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 57-69; (j) Imahori, H.; Norieda, H.; Yamada, H.; Nishimura, Y.; Yamazaki, I.; Sakata, Y.; Fukuzumi, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 100-110; (k) Koepf, M.; Trabolsi, A.; Elhabiri, M.; Wytke, J. A.; Paul, D.; Albrecht-Gary, A. M.; Weiss, J., *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1279-1282; (l) Kumaresan, D.; Agarwal, N.; Gupta, I.; Ravikanth, M., *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5347-5356; (m) Lee, C.-H.; Lindsey, J. S., *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11427-11440; (n) Lee, C. Y.; Hupp, J. T., *Langmuir* **2010**, *26*, 3760-3765; (o) Lee, C. Y.; Jang, J. K.; Kim, C. H.; Jung, J.; Park, B. K.; Park, J.; Choi, W.; Han, Y.-K.; Joo, T.; Park, J. T., *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 5586-5599; (p) Li, F.; Yang, S. I.; Ciringh, Y.; Seth, J.; Martin, C. H.; Singh, D. L.; Kim, D. H.; Birge, R. R.; Bocian, D. F.; Holten, D.; Lindsey, J. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10001-10017; (q) Loudet, A.; Burgess, K., *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891-4932; (r) Maligaspe, E.; Tkachenko, N. V.; Subbaiyan, N. K.; Chitta, R.; Zandler, M. E.; Lemmetyinen, H.; D'Souza, F., *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 8478-8489; (s) Ulrich, G.; Ziessel, R.; Harriman, A., *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184-1201; (t) Wagner, R. W.; Lindsey, J. S.; Seth, J.; Palaniappan, V.; Bocian, D. F., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3996-3997; (u) Wijesinghe, C. A.; El-Khouly, M.; Subbaiyan, N. K.; Supur, M.; Zandler, M. E.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S.; D'Souza, F., *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3147-3156; (v) Wood, T. E.; Thompson, A., *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1831-1861; (w) Zhang, X.; Xiao, Y.; Qian, X. H., *Org. Lett.* **2008**, *10*, 29-32; (x) Bozdemir, O. A.; Erbas-Cakmak, S.; Ekiz, O. O.; Dana, A.; Akkaya, E. U., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10907-10912; (y) Amin, A. N.; El-Khouly, M. E.; Subbaiyan, N. K.; Zandler, M. E.; Fukuzumi, S.; D'Souza, F., *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 206-208; (z) D'Souza, F.; Wijesinghe, C. A.; El-Khouly, M. E.; Hudson, J.; Niemi, M.; Lemmetyinen, H.; Tkachenko, N. V.; Zandler, M. E.; Fukuzumi, S., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, *13*, 18168-18178.
2. (a) Gabe, Y.; Ueno, T.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T., *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 621-626; (b) Tahtaoui, C.; Thomas, C.; Rohmer, F.; Klotz, P.; Duportail, G.; Mély, Y.; Bonnet, D.; Hibert, M., *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 269-272.
 3. Baumler, W.; Penzkofer, A., *Chem. Phys.* **1990**, *140*, 75-97.
 4. Schäfer, F. P. In *Topics in Applied Physics: Structure and Properties of Laser Dyes*. Springer-Verlag: Berlin, 1990; Vol. 1, Dye Lasers.
 5. (a) Harvey, P. D., In *The Porphyrin Handbook* Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. Academic Press: Boston, 2003; Vol. 18, p 63; (b) Harvey, P. D.;

- Stern, C.; Guillard, R., In *Handbook of Porphyrin Science With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*, Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Eds. World Scientific Publishing: : Singapore, 2011; pp 1-179.
6. (a) Förster, T., *Naturwissenschaften* **1946**, 33, 166-175; (b) Förster, T., *Ann. Phys.* **1948**, 2, 55-73.
 7. Li, B.; Li, J.; Fu, Y.; Bo, Z., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3430-3431.
 8. (a) Aly, S. M.; Ayed, C.; Stern, C.; Guillard, R.; Abd-El-Aziz, A. S.; Harvey, P. D., *Inorg. Chem.* **2008**, 47, 9930–9940; (b) Loutfy, R. O.; Law, K. Y., *J. Phys. Chem.* **1980**, 84, 2803-2808.

2.3 Discussion générale

Plusieurs remarques peuvent être formulées au vu des travaux présentés dans l'article III :

- La méthode de *O*-fonctionnalisation a permis d'introduire facilement deux dérivés porphyriniques sur le BODIPY avec de bons rendements de réaction. De plus, le *O*-BODIPY ainsi formé a résisté aux conditions utilisées pour la métallation des deux porphyrines.
- Dans les deux systèmes d'antenne élaborés (**3** et **4**) la vitesse de transfert d'énergie est relativement basse en comparaison à d'autres systèmes BODIPY-porphyrine similaires décrits dans la littérature.^{189,190} Notons que les systèmes d'antenne pour lesquels les bras espaceurs reliant les chromophores sont rigides présentent classiquement des vitesses de transfert d'énergie plus faibles que lorsqu'un espaceur flexible est utilisé.¹⁷⁷ Il serait intéressant d'utiliser une porphyrine de type *p*-monohydroxytetratolylporphyrine) pour rigidifier le système (Figure 59).

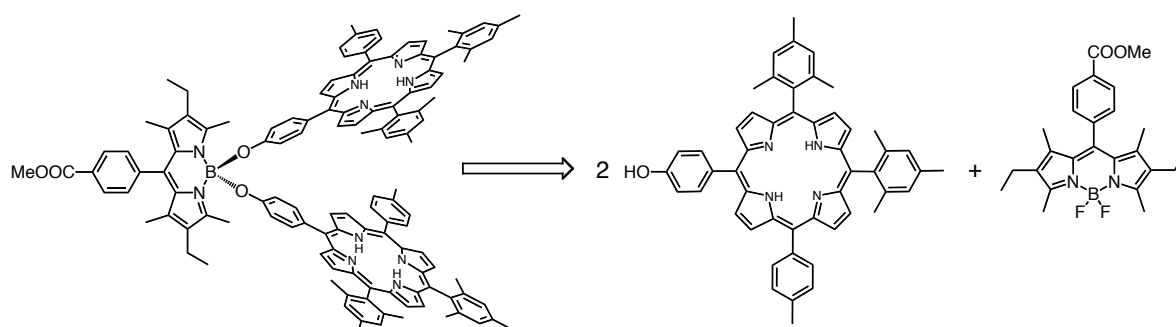


Figure 59 : rétrosynthèse envisagée pour l'élaboration d'un système *O*-BODIPY-bisporphyrine conjugué.

Notons enfin que le BODIPY-ester utilisé au cours de ces travaux possède une fonction réactive en position *meso*. Elle pourrait être utilisée pour l'introduction de divers carbocycles (naphtalène, anthracène, pyrène...) dans le but d'élargir la plage d'absorption du système d'antenne.

Contribution à l'article III.

La synthèse des différents composés a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Jean-Michel Barbe et Claude Gros, spécialisée dans la synthèse et la post-modification des porphyrines. Différents systèmes d'antennes entre divers chromophores et des porphyrines ont été précédemment décrits par cette équipe.^{189,191} La porphyrine **2** (monohydroxyméthyltétraphénylporphyrine) a été synthétisée au cours des travaux de doctorat d'Antoine Eggenspiller. Antoine a également réalisé la synthèse et la caractérisation des deux systèmes BODIPY-diporphyrines décrits dans cet article ainsi que du composé-modèle **1**. Mon rôle dans ces travaux a été de synthétiser et de caractériser le BODIPY-ester précurseur, et de réaliser la caractérisation photophysique des différents composés décrits dans cet article.

Concernant la rédaction de l'article, j'ai participé à la rédaction des différentes parties de l'article III, avec une contribution principale pour la rédaction de la partie photophysique. Pierre D. Harvey, Antoine Eggenspiller, Claude Gros, Christine Goze, Franck Denat et Jean-Michel Barbe ont également participé à la rédaction et à la correction de l'article.

3 Transfert d'énergie dans des systèmes BODIPY-corrole

3.1 Introduction

3.1.1 Généralités sur les corroles

Les corroles sont des macrocycles comportant quatre unités pyrroliques et qui diffèrent des porphyrines de par la présence d'une liaison directe pyrrole-pyrrole (Figure 60). Ils ont été décrits pour la première fois en 1965, leur préparation nécessitait alors des synthèses multi-étapes à faible rendement de réaction.¹⁹² La découverte par l'équipe de Gross, en 1999, d'une méthode de synthèse directe à partir du pyrrole, a relancé l'intérêt de la communauté scientifique pour ces composés.¹⁹³

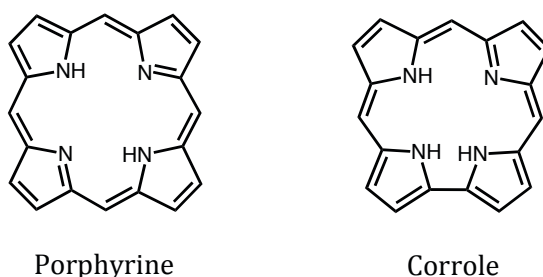


Figure 60 : Schéma d'une porphyrine et d'un corrole.

Les corroles possèdent un certain nombre de propriétés qui les différencient des porphyrines. Ils permettent notamment d'effectuer facilement une monofonctionnalisation au niveau de la position *meso* opposée au lien pyrrole-pyrrole (position *meso*-aryle).¹⁹⁴ Ce lien confère aux corroles une relative instabilité chimique en milieu acide et en milieu oxydant, ainsi qu'une photosensibilité accrue par rapport aux porphyrines, particulièrement pour les bases libres.^{195,196} De nombreux métaux peuvent être stabilisés dans la cavité macrocyclique, parmi lesquels des ions métalliques à haut degré d'oxydation (notamment le Chrome(V)),¹⁹⁷ des métaux utilisables pour la catalyse (Mn, Rh, Fe)^{198,199}. Les corroles de silicium ont également été étudiés pour la thérapie photodynamique tandis que les corroles de gallium, qui possèdent une forte cytotoxicité, ont été étudiés comme agents de détection et d'élimination de tumeurs.^{200,201} Concernant les applications biomédicales, il faut souligner que ces macrocycles

possèdent une grande affinité vis-à-vis des protéines, notamment de la sérum albumine,²⁰² et que des moyens permettant leur hydrosolubilisation ont été décrits.²⁰³ Ajoutons enfin que des applications concernant la conversion d'énergie solaire en électricité ont également été décrites pour des corroles de gallium(III) et d'étain(III).^{204,205}

Les multiples applications des corroles²⁰⁶ s'expliquent non seulement par la grande diversité de métaux pouvant être stabilisés par le macrocycle, mais aussi par leurs bonnes propriétés photophysiques. Par rapport aux porphyrines, les profils d'absorption et d'émission restent similaires, mais les rendements quantiques de fluorescence sont supérieurs, allant jusqu'à 31 % pour les corroles de gallium.^{207,208} Ces rendements quantiques accrus sont associés à la rigidité augmentée du métallo-corrole dont le cycle a été diminué d'un carbone.

3.1.2 Systèmes multichromophoriques à base de corrole pour le transfert d'énergie

Il existe peu d'exemples dans la littérature de systèmes multichromophoriques composés de corrole. La majorité d'entre eux associent une porphyrine à un corrole. Les travaux les plus complets dans ce domaine ont été réalisés par les groupes de R. Guillard et P. D. Harvey.¹⁹¹ Des systèmes porphyrine-corrole cofaciaux (avec les systèmes π -aromatiques face à face) complexant différents métaux ont été élaborés ; la Figure 61 montre l'un d'entre eux. L'intérêt de ces composés est de pouvoir contrôler la distance entre les deux chromophores en changeant la nature du bras espaceur, et d'étudier l'influence de cette distance sur le transfert d'énergie entre les deux chromophores. La baisse de la vitesse de transfert d'énergie dans le cas du second composé est attribuée à une diminution du facteur d'orientation de dipôles (κ^2).

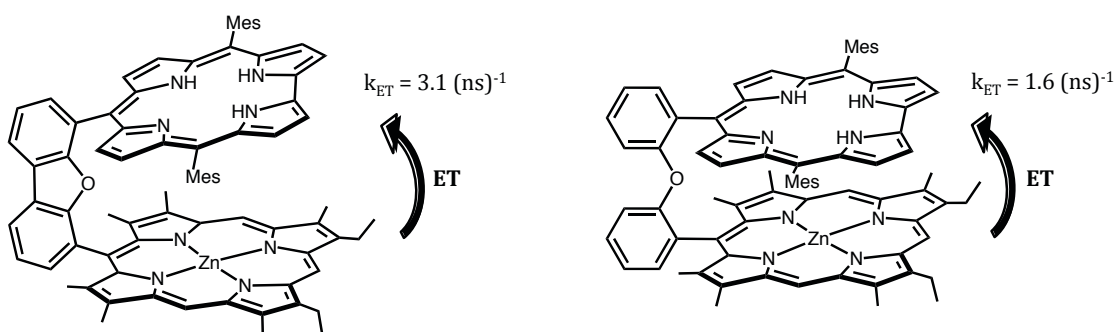


Figure 61 : dyades porphyrine-corrole cofaciales synthétisées par R. Guillard, P. D. Harvey et coll.¹⁹¹ k_{ET} calculé à 298K, dans le 2-MeTHF.

D'autres systèmes porphyrine-corrole utilisent la position apicale du métal au centre du corrole pour former la liaison avec la porphyrine. C'est notamment le cas du système développé R. Guillard, P. D. Harvey *et coll.* dans lequel une liaison métal-métal (Rh-Sn) assure la liaison entre les deux chromophores.²⁰⁹ Ce système n'est pas fluorescent, bien que le corrole d'étain précurseur utilisé pour la synthèse du système bichromophorique le soit. Ce phénomène est attribué à un croisement inter-système dû à un effet d'atome lourd. Ce système est d'ailleurs phosphorescent.

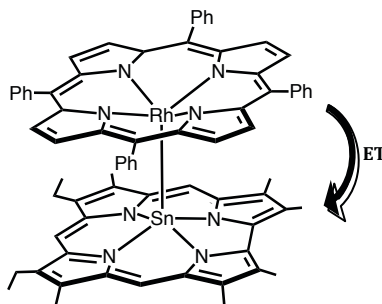


Figure 62 : dyade porphyrine-corrole élaborée par Poulin *et al.*²⁰⁹

Un autre exemple d'utilisation de la position apicale du corrole pour la liaison avec une porphyrine est représenté dans la Figure 63. Le corrole et la porphyrine sont perpendiculaire l'un à l'autre, limitant les interactions π - π entre les deux macrocycles.²¹⁰ Dans ces récents travaux, le transfert d'énergie de la porphyrine vers le corrole est mis en évidence mais aucune valeur de k_{ET} n'est rapportée.

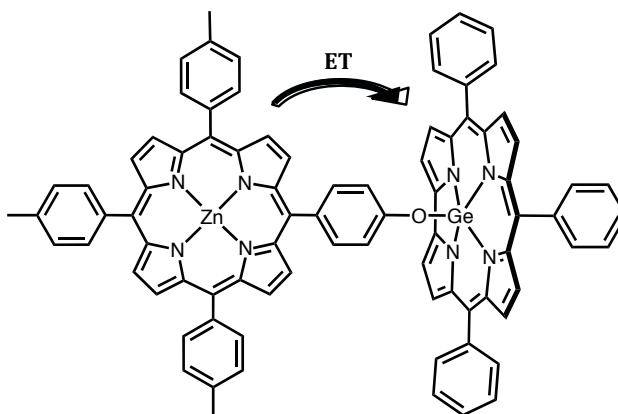


Figure 63 : système développé par L. Giribabu *et al.*²¹⁰

La Figure 64 montre un exemple de système trichromophorique corrole-bisporphyrine élaboré par le groupe de Campagna.²¹¹ Un transfert d'énergie du corrole vers les deux porphyrines est mis en évidence pour ce système (k_{ET} (298K) = 8 (ns)⁻¹). En appliquant la théorie du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) décrite dans le chapitre III.1.1.2.1, les auteurs de ces travaux déterminent une valeur

théorique de k_{ET} égale à 32 (ns)^{-1} . L'augmentation d'un facteur 4 entre la valeur expérimentale et la valeur théorique est attribuée aux incertitudes expérimentales ainsi qu'aux approximations de l'équation de Förster.

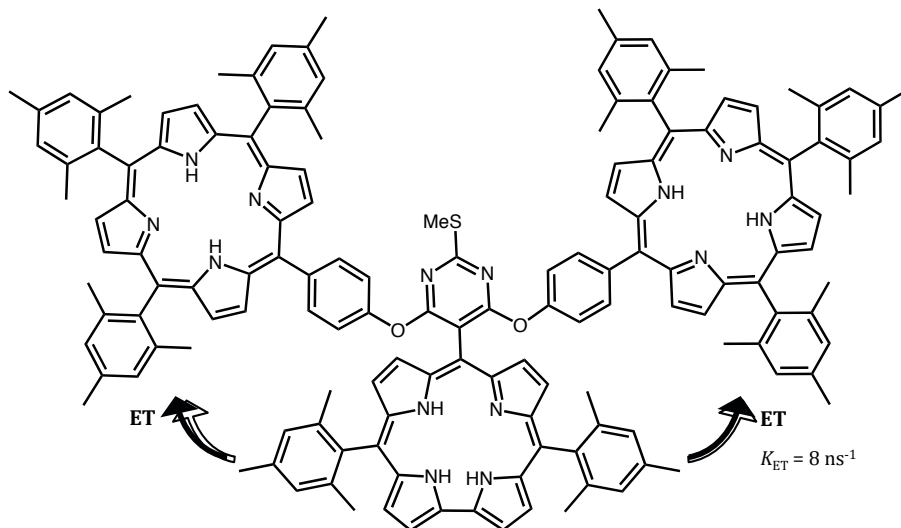


Figure 64 : système corrole-bisporphyrine élaboré par Ngo et al.²¹¹ k_{ET} calculé à 298K, dans le toluène.

Le groupe de Gryko et Flamigny a élaboré plusieurs systèmes à base de corroles fonctionnalisés par des dérivés du naphthalène. L'exemple donné dans la Figure 65 montre un corrole lié à une porphyrine de zinc par un espaceur comportant un motif naphthalène, ce qui permet d'augmenter l'absorption du système multichromophorique dans la zone UV.

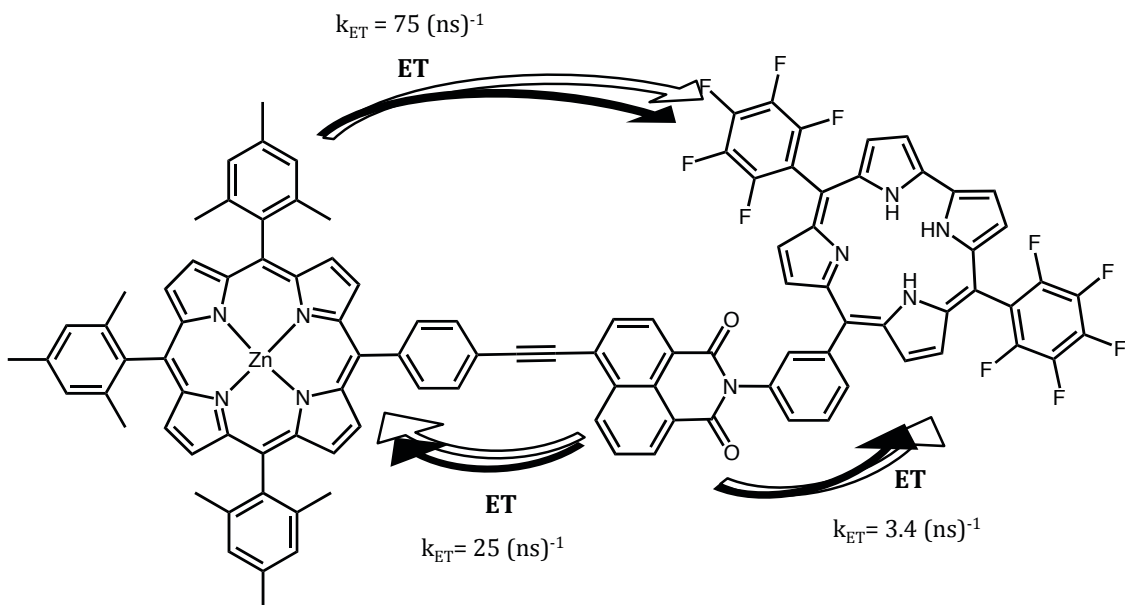


Figure 65 : système trichromophorique porphyrine-naphtalène-corrole élaboré par Ciuciu et al.²¹² k_{ET} calculé à 298K, dans le toluène.

D'autres chromophores ont également été liés à des corroles. De ces rares travaux, il faut citer les systèmes corrole-coumarine élaborés par le groupe de Flamigni²¹³, ainsi que les systèmes corrole-fullerène élaborés par le groupe de D'Souza.²¹⁴

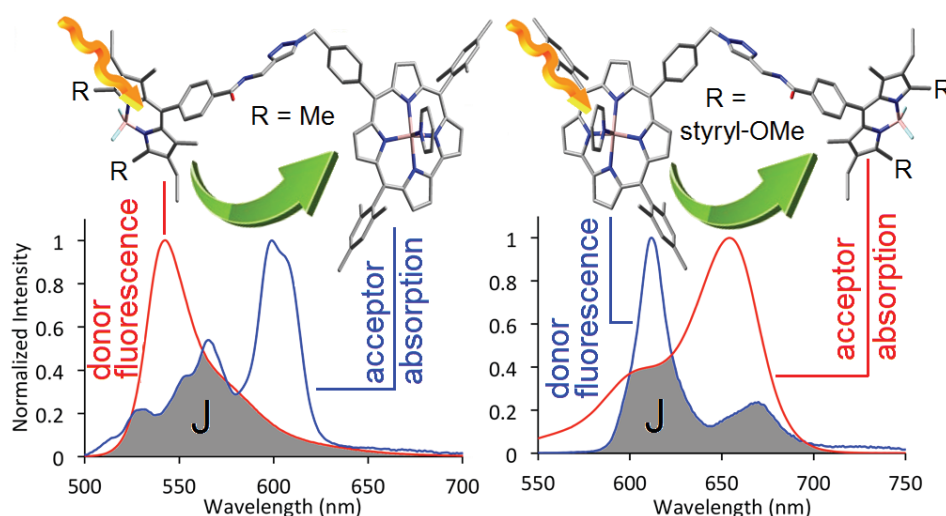
Au vu de la littérature sur les systèmes multichromophoriques à base de corroles, deux observations peuvent être faites :

- Les études de transfert d'énergie menées sur ces systèmes montrent que le corrole est systématiquement l'accepteur d'énergie.
- Aucun système BODIPY-corrole n'a été décrit à notre connaissance.

Dans l'article IV, nous présentons la synthèse et l'étude photophysique de plusieurs systèmes associant un corrole de gallium à différents BODIPY présentés dans le chapitre II.2. Un système BODIPY-biscorrole a également été élaboré. Ces BODIPY diffèrent notamment par le domaine de longueur d'onde d'absorption et d'émission, et jouent alternativement le rôle d'accepteur ou de donneur d'énergie.

3.2 Article IV

Résumé de l'article IV



La direction du transfert d'énergie singulet-singulet au sein de systèmes multichromophoriques à base de corrole de gallium(III) et de BODIPY peut aisément être modulée en fonction du nombre de groupes styryles portés par le BODIPY (corrole de gallium(III)* \rightarrow BODIPY sans groupement styryle, BODIPY* \rightarrow corrole de gallium(III) pour deux groupements styryles et les deux directions pour un seul groupement styryle). Dans le cas où le corrole de gallium et le BODIPY sont respectivement donneur et accepteur, le taux de transfert d'énergie est deux fois plus important que dans les deux autres situations. En utilisant la théorie du transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET), c'est l'intégrale J (recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur) qui est le paramètre prépondérant.

Slow and fast singlet energy transfers in BODIPY-gallium(III)corrole dyads linked by flexible chains

Bertrand Brizet,^{a,b} Nicolas Desbois,^a Antoine Bonnot,^b Adam Langlois,^b Adrien Dubois,^a Jean-Michel Barbe,^a Claude P. Gros,^{a*} Christine Goze,^{a*} Franck Denat^a and Pierre D. Harvey^{b*}

[a] *Institut de Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne, Université de Bourgogne, France.*

[b] *Département de Chimie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.*

Published in *Inorganic Chemistry*, 2014, 53, 3392-3403.

Synopsis. The direction of the singlet energy transfer in gallium(III)corrole-containing dyads can easily be reversed by putting no (BODIPY*→gallium(III)corrole), one (both directions) or two styryl groups (gallium(III)corrole*→ BODIPY) on BODIPY. The rates of energy transfer in the latter case are one order of magnitude larger than the former. Based on the Förster Resonance Energy Transfer theory (FRET), the dominant parameter explaining this difference is the J-integral (spectral overlap of the donor fluorescence with the acceptor absorption).

Keywords: BODIPY, gallium(III) corrole, fluorescence, singlet energy transfer

Abstract

Red (no styryl), green (monostyryl) and blue (distyryl)-BODIPY-gallium(III) corrole dyads have been prepared in high yields using click chemistry, and their photophysical properties are reported. An original and efficient control of the direction of the singlet energy transfers is reported, going either from BODIPY to the gallium-corrole units or from gallium-corroles to BODIPY, depending upon the nature of the substitution on BODIPY. In one case (green), the both directions were found possible. The mechanism for the energy transfers is interpreted by means of through space *Förster* Resonance Energy Transfer (FRET).

Introduction

Efforts have recently been devoted for the design of porphyrin-BODIPY dyads acting mainly as light harvesting antennas for the photochemical conversion of solar energy.¹ In almost all reported examples, the role of the BODIPY unit was to essentially fill the blue-green region of the visible spectrum where porphyrins absorb weakly (i.e. between the Soret and Q-bands). Indeed, increasing the number of chromophore molecules can contribute to cover absorption in the entire visible spectrum resulting *e.g.* in a panchromatic light capture. In this respect, other recent developments on porphyrin-BODIPY dyad indeed focused on a novel broad-band capturing and emitting system useful for solar energy harvesting.²

Concurrently, our group explored over the few years the chemistry of corrole macrocycles, akin to porphyrins but with one *meso* carbon atom less in their outer periphery.³ Literature investigations show that the insertion of gallium(III) into the corrole macrocycle can efficiently enhance their fluorescence intensity.⁴ This property is of prime importance for potential use of corroles in medicinal applications⁵ and photophysics⁶ particularly as fluorescent probes. This feature becomes even more appealing if these corrole macrocycles are incorporated into polychromophoric arrays. The first corrole gallium(III) complex as well as its X-ray structure were reported by Gross *et al.*⁷ The metallation of the corrole free base by GaCl₃ was shown to be convenient and preceded in almost quantitative yields.

Recently, we reported the synthesis and spectroscopic characterization of new zinc porphyrin-BODIPY dyads, exhibiting efficient singlet energy transfers. In one case, energy transfer occurs from BODIPY to the porphyrin⁸ whereas, in the case of blue π -conjugated BODIPY-zinc porphyrin tweezers, the energy transfer occurs in the opposite direction *e.g.* from the photoexcited singlet zinc porphyrin to the π -conjugated BODIPY moiety of the composites as compared to energy transfer from the singlet excited state of conventional BODIPY to zinc porphyrins.⁹

We now report the synthesis and spectroscopic characterization of new covalently linked red (no styryl), green (styryl-monosubstituted) and blue (styryl-disubstituted)-

BODIPY-gallium(III) corrole derivatives bridged by triazole linkers (Chart 1; see the real color of the solutions in Figure S1). To the best of our knowledge, no previous example of a corrole macrocycle covalently linked to BODIPY has been reported. Noteworthy, an original and efficient control of the direction of the singlet energy transfers is herein reported *e.g.* from BODIPY to the gallium-corrole units or from gallium-corroles to BODIPY, depending upon the nature of the BODIPY (blue, green or red).

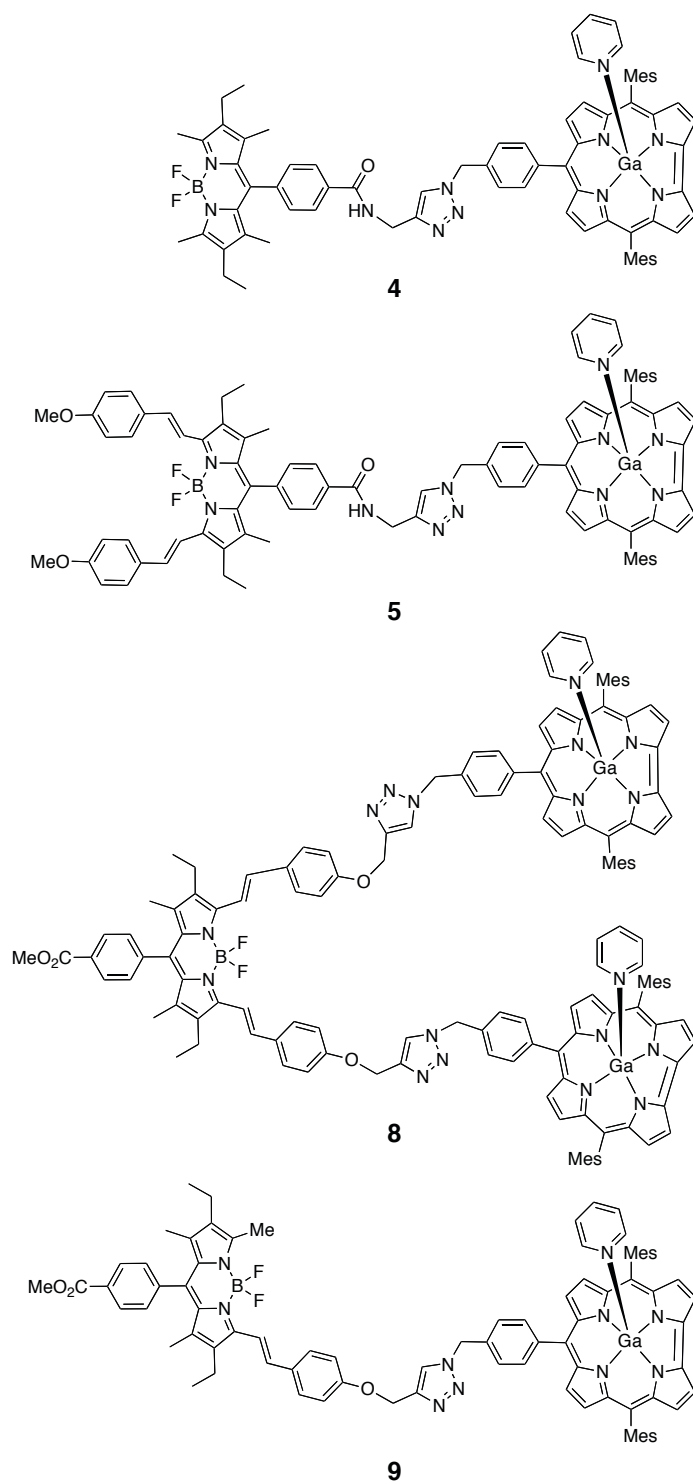


Chart 1: Structure of the different BODIPY-corrole dyads.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Unless otherwise stated, all chemicals and solvents were of analytical reagent grade and used as received. Absolute dichloromethane was obtained from Carlo Erba. Silica gel (Merck; 70-120 mm) was used for column chromatography. Analytical thin-layer chromatography was performed with Merck 60 F₂₅₄ silica gel (precoated sheets, 0.2 mm thick). Reactions were monitored by thin-layer chromatography, UV/Vis spectroscopy and MALDI/TOF mass spectrometry.

Instrumentation. The ¹H, ¹¹B and ¹³C NMR spectra were recorded at room temperature on a Bruker Avance II 300 (300 MHz) or on a Bruker Avance DRX 600 (600 MHz) spectrometer at the “*Welience, Pôle Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (WPCM)*”. Chemical shifts (¹H NMR spectra) are expressed in ppm relative to chloroform (7.26 ppm) or pyridine (7.22, 7.58, 8.74). UV–visible spectra were recorded on a Varian Cary 300 Bio spectrophotometer. Mass spectra and accurate mass measurements (HR-MS) were obtained on a Bruker Daltonics Ultraflex II spectrometer in the MALDI/TOF reflectron mode using dithranol as a matrix or on a LTQ Orbitrap XL (THERMO) instrument in ESI mode. Both measurements were registered at “*Welience, Pôle Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (WPCM)*”. The steady-state fluorescence emission and excitation spectra were obtained on a Fluorolog SPEX 1680 0.22m double monochromator spectrometer using quartz cuvettes (1 cm, 3 mL). All fluorescence spectra were corrected for apparatus response. Fluorescence lifetimes were measured on an apparatus incorporating a nitrogen laser as the source and a high-resolution dye laser (fwhm = 1.4 ns). Fluorescence lifetimes were obtained from high-quality decays and deconvolution or distribution lifetime analysis. The uncertainties ranged from 20 to 40 ps on the basis of multiple measurements.

Quantum Yield Measurements. Measurements were performed in distilled 2-MeTHF and spectrophotometric grade methanol (Aldrich) was used for references. Quartz cuvettes of 3 mL with path length of 1 cm equipped with a septum were used, and all solutions were Ar-degassed prior to measurements. Three different measurements (*i.e.*, different solutions) were performed for each quantum yields. The sample concentrations were chosen to obtain an absorbance of about 0.05. The fluorescence quantum yield (Φ_F) measurements were performed with the slit width of 0.5-1.5 nm for both excitation and emission. Relative quantum efficiencies were obtained by comparing the areas under the corrected emission spectra of the sample relative to a known standard and the following equation was used to calculate quantum yield. $\Phi_F(\text{sample}) = \Phi_F(\text{standard}) (I_{\text{sample}}/I_{\text{standard}}) (A_{\text{standard}}/A_{\text{sample}}) (\eta_{\text{sample}}^2/\eta_{\text{standard}}^2)$ where $\Phi_F(\text{standard})$ is the reported quantum yield of the standard, I is the integrated emission spectrum, A is the absorbance at the excitation wavelength and η is the refractive index of the solvents used. Rhodamine 6G ($\Phi_F = 0.94$ in methanol),¹⁰ Cresyl Violet ($\Phi_F = 0.54$ in methanol),¹¹ and Rhodamine 101 ($\Phi_F = 1.00$ in

methanol)¹² were used as standards.¹³ In all Φ_F determinations, correction for the solvent refractive index (η) was applied (2-MeTHF: $\eta = 1.406$, methanol: $\eta = 1.328$).¹⁴

DFT Calculations. All computer modeling have been performed using the density functional theory (DFT) performed with Gaussian 09¹⁵ at the Université de Sherbrooke with the Mammouth supercomputer supported by “*Le Réseau Québécois De Calculs Hautes Performances*”. The DFT geometry optimizations¹⁶ were carried out using the B3LYP method. A 6-31g* basis set was used for C, H, N and F atoms. VDZ (valence double ζ) with SBKJC effective core potential was used for B, Ga atoms.¹⁷

Synthesis. 10-(4-Azidomethylphenyl)-5,15-dimesitylcorrole gallium(III)(pyridine) (1). 10-(4-Azidomethylphenyl)-5,15-dimesitylcorrole^{3a} (50.0 mg, 0.075 mmol) was added to a solution of GaCl₃ 0.114 M in dry pyridine (6.6 mL, 0.75 mmol). The reaction mixture was stirred to reflux for 1 h 30, shielded from light. The solvent was removed and the crude product was purified by column chromatography over silica (pentane-dichloromethane-pyridine, 100:30:0.5). The title compound **1** was isolated as a purple microcrystalline solid in 69% yield (42.0 mg, 0.052 mmol). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.88 (s, 12H, CH₃), 2.61 (s, 6H, CH₃), 3.58 (m, 2H, H_{Py}), 4.66 (s, 2H, CH₂), 5.97 (m, 2H, H_{Py}), 6.76 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_{Py}), 7.26 (s, 4H, H_{Mes}), 7.63 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{Ph}), 8.16 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{Ph}), 8.55 (m, 4H, H _{β}), 8.62 (d, 2H, $J = 4.5$ Hz, H _{β}), 9.01 (d, 2H, $J = 3.9$ Hz, H _{β}). UV-visible (2-MeTHF): λ_{\max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3}$ L mol⁻¹ cm⁻¹) = 418 (206), 527 (7), 566 (13), 599 (26). MS (MALDI-TOF) $m/z = 731.03$ [M-Pyridine]⁺, 731.23 calcd for C₄₄H₃₆GaN₇. HR-MS (ESI) $m/z = 731.2263$ [M-Pyridine]⁺, 731.2283 calcd for C₄₄H₃₆GaN₇.

Compound 2. *N*-Hydroxybenzotriazole (959 mg, 7.10 mmol), diisopropylamine (995 μ L, 7.10 mmol), 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (1.35 g, 7.10 mmol) and propargylamine (227 μ L, 3.50 mmol) were successively added to a solution of BODIPY acid¹⁸ (1.53 g, 3.50 mmol) in 100 mL of dimethylformamide and the solution was stirred at room temperature. After total consumption of starting material (2 h) monitored by TLC, the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3x100 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated to give a red oil. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/heptane 60:40) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give a reddish solid in 72% yield (1.15 g, 2.49 mmol). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.96 (t, $J = 7.5$ Hz, 6H), 1.22 (s, 6H), 2.29 (q, $J = 7.5$ Hz, 4H), 2.30 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H), 2.51 (s, 6H), 3.78 (dd, $J = 2.5$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 2H), 6.27 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.91 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 11.9, 12.5, 14.6, 17.1, 30.9, 72.1, 79.3, 127.8, 128.9, 130.4, 133.1, 134.0, 138.1, 138.5, 139.7, 154.3, 166.2. ¹¹B NMR (192.5 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.78 (t, $J = 33.4$ Hz). UV-visible (2Me-THF) λ_{\max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3}$ L mol⁻¹ cm⁻¹): 238 (39),

494 (27), 525 (90). MS (ESI) $m/z = 460.39$ $[M+H]^+$, 484.34 $[M+Na]^+$. HRMS (ESI) 484.23559 calcd for $C_{27}H_{30}BF_2N_3ONa$ 484.23470.

Compound 3. Compound **2** (100 mg, 0.22 mmol) and *p*-anisaldehyde (106 μ L, 0.870 mmol) were dissolved in a mixture of dry toluene (40 mL), *p*-toluenesulfonic acid (PTSA, 6.0 mg, 0.035 mmol) and piperidine (752 μ L, 7.60 mmol). The mixture was refluxed during 2 h in a Dean-Stark apparatus and the solvent was removed *in situ*. 40 mL of dry toluene and 750 μ L of piperidine were added and the mixture was refluxed for another 2 h. After total consumption of the starting material (monitored by UV-Vis), the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3x100 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated to give a blue solid. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (heptane/ CH_2Cl_2 80 : 20) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give a blue solid in 36% yield (55.0 mg, 78.8 μ mol). 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1.14 (t, $J = 7.5$ Hz, 6H), 1.28 (s, 6H), 2.32 (t, $J = 2.5$ Hz, 1H), 2.58 (q, $J = 7.5$ Hz, 4H), 3.84 (s, 6H), 4.30 (dd, $J = 2.5$ Hz, $J = 5.2$ Hz, 2H), 6.36 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 7.20 (d, $J = 16.7$ Hz, 2H), 7.43, (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H), 7.65 (d, $J = 16.7$ Hz, 2H), 7.93 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.8, 14.1, 18.4, 55.4, 72.2, 79.3, 114.3, 127.8, 128.9, 129.4, 130.3, 132.5, 133.9, 134.1, 135.8, 136.1, 138.3, 140.1, 150.9, 160.3, 166.3. ^{11}B NMR (192.5 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1.23 (t, $J = 34.2$ Hz). UV-visible (2-MeTHF): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} L mol^{-1} cm^{-1}$): 250 (21), 334 (31), 368 (68), 608 (37), 654 (93). MS (ESI): $m/z = 720.35$ $[M+Na]^+$. HRMS (ESI) 720.32039 calcd for $C_{43}H_{42}BF_2N_3O_2Na$ 720.31869.

Compound 6. BODIPY ester^{18a} (200 mg, 0.46 mmol) and 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (73.0 mg, 0.460 mmol) were dissolved in a mixture of dry toluene (20 mL), *p*-toluenesulfonic acid (PTSA, 50.0 mg, 0.290 mmol) and piperidine (989 μ L, 10.0 mmol). The mixture was refluxed during 2 h in a Dean-Stark apparatus. The solvent was removed *in situ*, 10 mL of dry toluene and 73 mg of 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde was added. Mixture was refluxed for another 1 h and solvent was removed. This step was repeated 5 times. After total consumption of starting material (monitored by UV-visible), the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3 x 50 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated to give a blue solid. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/heptane 50:50) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give **6** (133 mg, 184 μ mol) in 40 % yield as blue solid. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 1.13 (t, $J = 7.6$ Hz, 6H), 1.28 (s, 6H), 2.53 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.58 (q, $J = 7.6$ Hz, 4H), 3.97 (s, 3H), 4.73 (d, $J = 2.4$ Hz, 4H), 7.01 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.20 (d, $J = 16.6$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.66 (d, $J = 16.6$ Hz, 2H), 8.20 (d,

$J = 8.2$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 10.7, 13.0, 17.4, 51.4, 54.9, 74.7, 77.3, 114.2, 117.5, 127.8, 128.1, 129.3, 129.6, 130.1, 131.5, 133.0, 134.6, 137.4, 140.8, 149.8, 151.2, 157.1, 165.6. UV-visible (2-MeTHF): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 255 (21), 332 (31), 366 (63), 428 (11), 604 (36), 654 (85). ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1.20 (t, $J = 34.6$ Hz). MS (ESI): $m/z = 745.30$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI) 745.30308 calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{41}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ 745.30273.

Compound 7. BODIPY ester^{18a} (1.10 g, 2.51 mmol) and 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (442 mg, 2.76 mmol) were dissolved in a mixture of dry toluene (50 mL), *p*-toluenesulfonic acid (PTSA, 53.0 mg, 0.308 mmol) and piperidine (3.3 mL, 33 mmol). The mixture was refluxed during 2 h in a Dean-Stark apparatus and the solvent was removed *in situ*. 50 mL of dry toluene and 3 mL of piperidine were added and the mixture was refluxed for another 2 h. After consumption of approximately a third of starting material (monitored by UV-visible), the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3 x 100 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated to give a blue solid. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/heptane 40:60) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give **7** (73.0 mg, 125 μmol) in 5% yield. Compound **6** was also obtained as subproduct in 3 % yield. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 1.12 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 2.29 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.52 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 2.56 (s, 3H), 2.56 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 4.71 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.97 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H), 8.16 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 11.8, 12.1, 13.0, 14.3, 14.7, 17.3, 17.5, 18.5, 52.6, 56.1, 75.9, 78.6, 115.4, 118.6, 128.8, 129.1, 130.5, 130.9, 131.3, 131.6, 133.4, 134.0, 135.1, 138.0, 141.1, 150.0, 155.8, 158.2, 166.8. ^{11}B NMR (192.5 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.98 (t, $J = 33.8$ Hz). UV-visible (2-MeTHF): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 238 (19), 319 (17), 339 (29), 389 (8), 448 (27), 587 (81). MS (ESI): $m/z = 603.4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI) 603.26233 calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{35}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ 603.26071.

General procedure for the Huisgen reaction. 10-(4-Azidomethylphenyl)-5,15-dimesityl-corrole gallium(III)(pyridine) (30.0 mg, 37.0 μmol or 60.0 mg, 74.0 μmol for preparation of compound **8**) and BODIPY alkyne (37.0 μmol) were solubilized in 5 mL of THF. CuI (10.5 mg, 55.1 μmol or 21.0 mg, 110 μmol for preparation of compound **8**) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) (14.0 μL , 148 μmol) were added. The mixture was stirred under N_2 at RT for 3 h. The crude mixture was evaporated to dryness. Then 20 mL of water was added. The compound was extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The collected organic solution was dried over MgSO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. The product was recrystallized from CH_2Cl_2 -Hexane.

Compound 4. The title compound was isolated as a purple microcrystalline solid in 96% yield (45.0 mg, 35.4 μmol). ^1H NMR (300 MHz, Pyridine- d_5) δ (ppm): 0.84 (m, 6H, CH_3), 1.20 (s, 6H, CH_3), 2.13 (m, 16H, CH_2 , CH_3), 2.62 (s, 6H, CH_3), 2.70 (s, 6H, CH_3), 5.25 (d, 2H, $J = 5.1$ Hz, CH_2N), 6.05 (s, 2H, CH_2), 7.38 (m, 6H, H_{mes} , H_{Ph}), 7.49 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazole}}$), 7.76 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz, H_{Ph}), 8.20 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{Ph}), 8.46 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{Ph}), 8.79 (m, 4H, H_{β}), 8.88 (d, 2H, $J = 4.5$ Hz, H_{β}), 9.25 (d, 2H, $J = 3.9$ Hz, H_{β}), 10.07 (m, 1H, NH). UV-visible (2-MeTHF): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 419 (150), 525 (80), 567 (13), 600 (21). MS (MALDI-TOF) $m/z = 1173.46$ $[\text{M-Pyridine-F}]^+$, 1173.47 calcd for $\text{C}_{71}\text{H}_{66}\text{BFGaN}_{10}\text{O}$. HR-MS (ESI) $m/z = 1192.4762$ $[\text{M-Pyridine}]^+$, 1192.4744 calcd for $\text{C}_{71}\text{H}_{66}\text{BF}_2\text{Ga}\text{N}_{10}\text{O}$.

Compound 5. The title compound was isolated as a purple microcrystalline solid in 97% yield (54.0 mg, 35.8 μmol). ^1H NMR (300 MHz, Pyridine- d_5) δ (ppm): 1.04 (t, 6H, $J = 7.2$ Hz, CH_3), 1.24 (s, 6H, CH_3), 2.11 (s, 12H, CH_3), 2.56 (m, 10H, CH_2 , CH_3), 3.65 (s, 6H, OCH_3), 5.25 (d, 2H, $J = 5.1$ Hz, CH_2N), 6.04 (s, 2H, CH_2), 6.91 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H_{Ph}), 7.37 (m, 6H, H_{mes} , H_{Ph}), 7.50 (m, 3H, H_{alkene} , $\text{H}_{\text{triazole}}$), 7.71 (m, 6H, H_{Ph}), 8.19 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{Ph}), 8.29 (d, 2H, $J = 16.5$ Hz, H_{alkene}), 8.47 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{Ph}), 8.76 (m, 4H, H_{β}), 8.86 (d, 2H, $J = 4.5$ Hz, H_{β}), 9.23 (d, 2H, $J = 3.9$ Hz, H_{β}), 10.08 (m, 1H, NH). UV/Vis (2-MeTHF): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 368 (83), 419 (164), 605 (58), 654 (96). MS (MALDI-TOF) $m/z = 1428.46$ $[\text{M-Pyridine}]^+$, 1428.56 calcd for $\text{C}_{87}\text{H}_{78}\text{BF}_2\text{Ga}\text{N}_{10}\text{O}_3$. HR-MS (ESI) $m/z = 1428.5610$ $[\text{M-Pyridine}]^+$, 1428.5583 calcd for $\text{C}_{87}\text{H}_{78}\text{BF}_2\text{Ga}\text{N}_{10}\text{O}_3$.

Compound 8. The title compound was isolated as a purple microcrystalline solid in 97% yield (84 mg, 35.8 μmol). ^1H NMR (300 MHz, Pyridine- d_5) δ (ppm): 1.09 (m, 6H, CH_3), 1.29 (2s, 6H, CH_3), 2.13 (s, 24H, CH_3), 2.61 (m, 16H, CH_2 , CH_3), 3.94 (s, 3H, OCH_3), 5.48 (s, 4H, CH_2), 6.07 (s, 4H, CH_2), 7.29 (m, 4H, H_{Ph}), 7.37 (m, 8H, H_{mes}), 7.50 (m, 6H, $\text{H}_{\text{triazole}}$, H_{alkene} , H_{Ph}), 7.76 (m, 6H, H_{Ph} , H_{Ph}), 8.34 (m, 10H, H_{Ph} , H_{alkene}), 8.79 (m, 8H, H_{β}), 8.88 (d, 4H, $J = 4.5$ Hz, H_{β}), 9.24 (d, 4H, $J = 3.9$ Hz, H_{β}). UV/Vis (2-MeTHF): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 372 (63), 419 (244), 568 (32), 602 (60), 658 (63). MS (MALDI-TOF) $m/z = 2165.76$ $[\text{M-Pyridine-F}]^+$, 2165.77 calcd for $\text{C}_{133}\text{H}_{113}\text{BFGa}_2\text{N}_{16}\text{O}_4$. HR-MS (ESI) $m/z = 1092.8895$ $[\text{M-2Pyridine}]^{2+}$, 1092.8832 calcd for $\text{C}_{133}\text{H}_{113}\text{BF}_2\text{Ga}_2\text{N}_{16}\text{O}_4$.

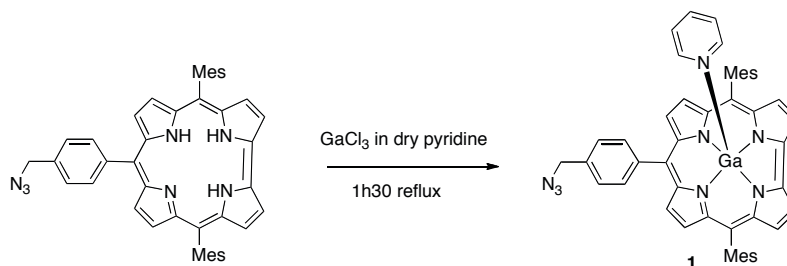
Compound 9. The title compound was isolated as a purple microcrystalline solid in 96% yield (49.5 mg, 35.6 μmol). ^1H NMR (300 MHz, Pyridine- d_5) δ (ppm): 0.89 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH_3), 1.08 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, CH_3), 1.32 (2s, 6H, CH_3), 2.14 (m, 14H, CH_2 , CH_3), 2.63 (m, 8H, CH_2 , CH_3), 2.77 (s, 3H, CH_3), 3.93 (s, 3H, OCH_3), 5.52 (s, 2H, CH_2), 6.12 (s, 2H, CH_2), 7.35 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H_{Ph}), 7.38 (m, 4H, H_{mes}), 7.50 (m, 4H, H_{Ph} , H_{alkene} , $\text{H}_{\text{triazole}}$), 7.76 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H_{Ph}), 7.81 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H_{Ph}), 8.33 (m, 5H, H_{alkene} , H_{Ph}), 8.80 (m, 4H, H_{β}), 8.89 (d, 2H, $J = 4.5$ Hz, H_{β}), 9.26 (d, 2H, $J = 3.9$ Hz, H_{β}). UV/Vis (2-MeTHF): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 340 (34), 418 (145), 591 (84). MS

(MALDI-TOF) $m/z = 1292.51$ $[M\text{-Pyridine-F}]^+$, 1292.50 calcd for $C_{79}H_{71}BFGaN_9O_3$. HR-MS (ESI) $m/z = 1311.5018$ $[M\text{-Pyridine}]^+$, 1311.5004 calcd for $C_{79}H_{71}BF_2GaN_9O_3$.

Results and Discussion

Synthesis. The azide-containing free base corrole (see starting product in Scheme 1) was prepared using the common “2+1” method.¹⁹ The preparation involves the condensation of an azidobenzyl aldehyde (1 equiv.) with a mesityldipyrrromethane (2 equiv.) in the presence of a catalytic amount of trifluoroacetic acid (TFA, 0.08 equiv.) using dichloromethane as solvent. Sterically hindered mesityl-dipyrrromethane was used in order to avoid any acidolysis that could occur during the cyclization reaction.

Gallium(III) was inserted in the corrole cavity according to a literature procedure.^{7, 19} The inorganic salts were separated from the desired product by column chromatography on silica gel affording the (pyridine)gallium(III) corrole **1** in 69% yield (Scheme 1). The formation of the gallium-corrole **1** was monitored by MALDI-TOF mass spectrometry using the molecular peak at $m/z = 731.2263$ (731.2283 calcd for $C_{44}H_{36}GaN_7$) which shows a characteristic isotopic pattern corresponding to $[M\text{-pyridine}]^+$. The coordination of one pyridine molecule to the gallium metal center was confirmed by 1H NMR spectroscopy.

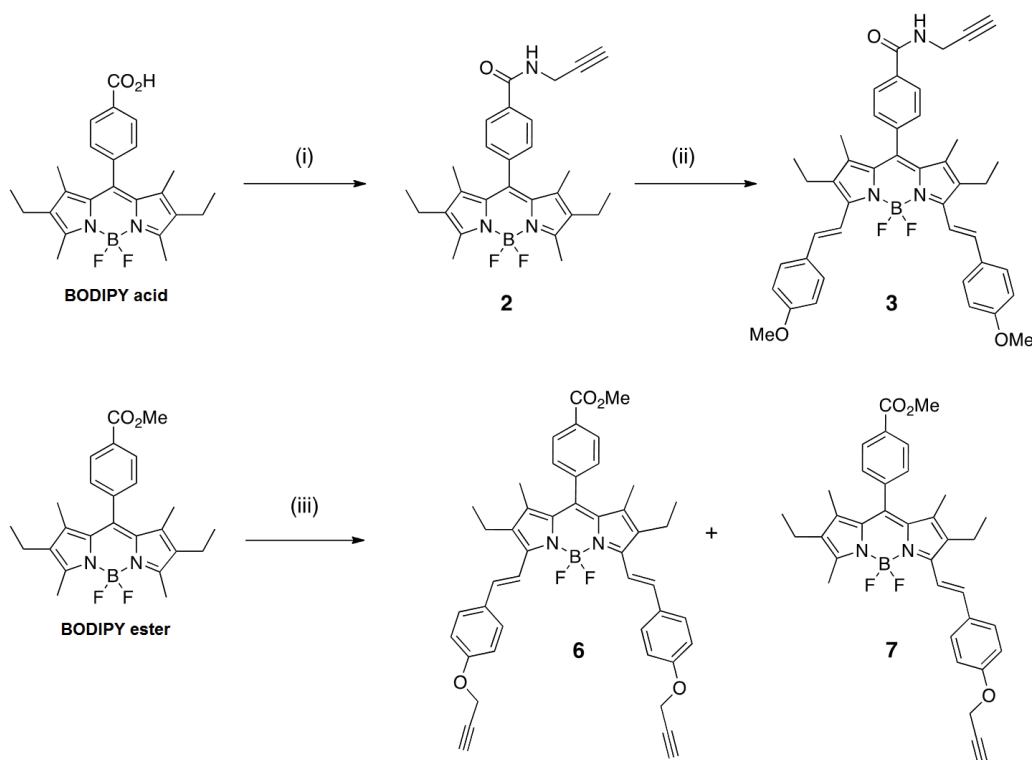


Scheme 1: Synthesis of gallium-corrole **1**.

Ethynyl-functionalized BODIPY **2** could easily be obtained by peptidic coupling between propargylamine and a BODIPY bearing a carboxylic group (generated from the methyl ester) in *meso* position as previously described in the literature.²⁰ The coupling reagent we used (Scheme 1) was based on a carbodiimide (e.g. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDCI.HCl) in the presence of 1-hydroxy-1H-benzotriazole (HOBt) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA). The ethylenic proton exhibits a triplet ($\delta = 2.30$, $^4J_A = 2.5$ Hz) in $CDCl_3$ 1H NMR spectroscopy. The distyryl BODIPY **3** was synthesized using a reported method, which consists in a Knoevenagel condensation between **2** and four equivalents of *p*-anisaldehyde with *p*-toluenesulfonic acid (PTSA) and piperidine, in a Dean Stark apparatus, using dry toluene as the solvent.⁹

Similarly, the di- and mono-styryl precursors **6** and **7** were respectively obtained using the same reaction, starting from carbomethoxy-*meso*-substituted BODIPY

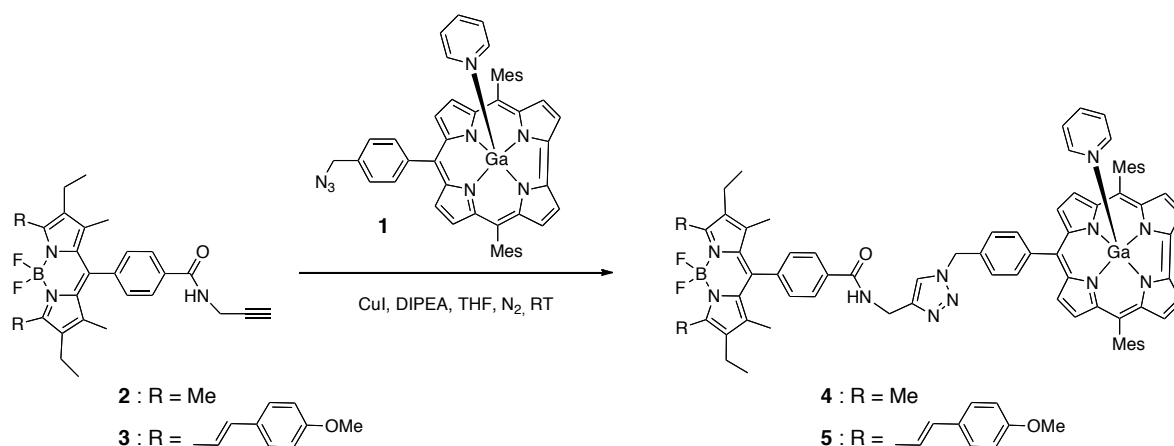
derivative and 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde. The reaction was monitored by UV-visible spectroscopy in order to obtain the maximal quantity of monocondensation product **7**. Difficulties in purification and formation of dicondensation subproduct **6** explain the low yield of reaction for **7** (5 %). Nevertheless compound **6** can be obtained in good yield (40 %) by using a larger quantity of 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde, as described in the experimental section.



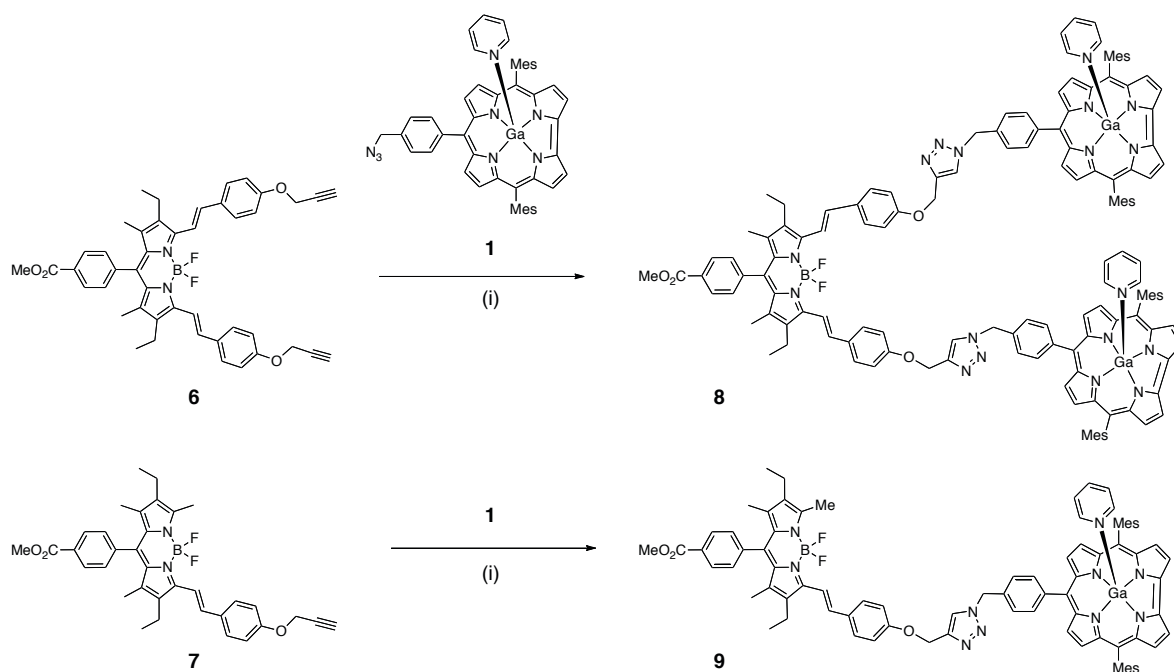
Scheme 2: Synthesis of **2**, **3**, **6** and **7**. (i) HOBt, EDCI.HCl, DIPEA, propargylamine, DMF, RT; (ii) *p*-anisaldehyde, PTSA, piperidine, dry toluene, reflux; (iii) 4-(prop-2-yn-1-yloxy)-benzaldehyde, PTSA, piperidine, dry toluene, reflux.

The Huisgen copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, known as “click reaction”,²¹ was used to efficiently link the BODIPY and the gallium-corrole subunits. Indeed, many reports have already mentioned the usefulness of the click chemistry for the elaboration of sophisticated structures involving mainly porphyrin as the backbone.^{9, 22} We applied a recent methodology described for the preparation of tripod porphyrins.²² The reaction, catalyzed by CuI/di(isopropyl)ethylamine (DIPEA), proceeds quantitatively in THF at room temperature for three hours (Schemes 3 and 4). All BODIPY-Ga(III)-corroles were fully characterized by ¹H NMR spectroscopy in pyridine-d₅. HR-MS measurements were performed using an ESI-Orbitrap instrument to further confirm the successful formation of compounds **4-5** and **8-9**. For example for compound **8**, the molecular peak is observed at $m/z = 2165.76$ [M-Pyridine-F]⁺ in the MALDI-TOF spectra,

(2165.77 calcd for $C_{133}H_{113}BFGa_2N_{16}O_4$) whereas by ESI HR-MS, the molecular peak appears at $m/z = 1092.8895$ $[M-2\text{Pyridine}]^{2+}$ (1092.8832 calcd for $C_{133}H_{113}BF_2Ga_2N_{16}O_4$).



Scheme 3: Synthesis of **4** and **5**. (i) CuI, DIPEA, THF, N_2 , RT.



Scheme 4: Synthesis of **8** and **9**. (i) CuI, DIPEA, THF, N_2 , RT.

Computer modeling. In order to address whether the possible conformations due to the flexibility of the chain are energetically accessible, geometry optimizations were performed by DFT computations on compounds **4** and **9**. The results from these computations are presented in Figure 1. Only representative examples were necessary to illustrate that many conformations co-exist and are of various energies. The most stable

conformations for **4** (and **5** due to their strong structural similarity) are the unfolded conformations C - E differing by only the relative orientation of the $C_6H_4CH_2$ group in the chain. Concurrently, the unfolded and semi-folded conformations D - F are noted to be the most stable ones for compound **9** but the semi-folded conformers B and C are only 1 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ destabilized with respect to the most stable ones. The folded conformer A is either too high in energy (**4**) or unstable (**9**). The conclusion is that many unfolded and semi-folded conformers co-exist in solution, but the folded conformer A is simply not accessible for **4** and **9**.

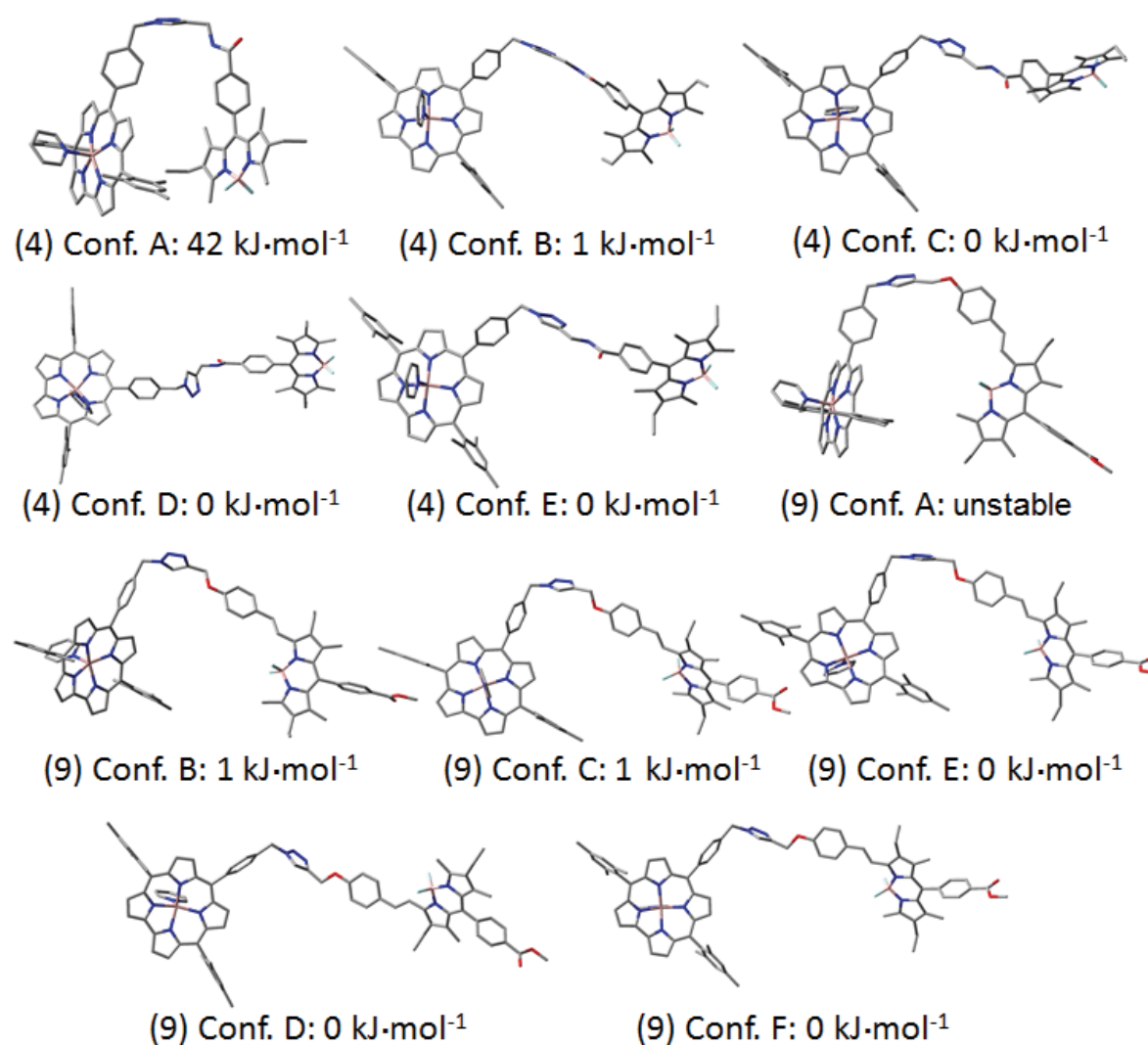


Figure 1. Some optimized geometries of compounds **4** and **9** in various conformations, notably folded and unfolded, indicating the relative stabilization energies with respect to the lowest energy conformations arbitrarily set at 0. Conformation A for **9** does not lead to any stable conformation upon geometry optimization. This conformation simply unfolds.

Electronic absorption spectra. Table 1 summarizes the UV–visible data for all compounds in 2-MeTHF. Compound **1** exhibits one Soret band at 418 nm and three Q bands at 527, 566 and 599 nm of the corrole chromophore. Compounds **2**, **3**, **6**, and **7** exhibit bands characteristic of the BODIPY chromophore; the S_0 – S_1 band at 525, 654, 587 and 658 nm is assigned to spin-allowed π – π^* transitions. Dyads **4**, **5**, **8** and **9** displays the expected corrole Soret band and Q-bands in addition to the BODIPY π – π^* transitions. The absorption spectra of the dyads are simply the sum of the individual chromophores (gallium-corrole and BODIPYs) and do not show any new bands or broadening of the base peaks suggesting that electronic mixing between chromophores is minimal or nonexistent. The absorption spectra of gallium-corrole lack of any significant absorption intensity in the region from 450 to 520 nm, thus allowing for selective excitation of the BODIPY donor chromophore for the examination of energy transfer (ET) processes from red-BODIPY to gallium-corrole. Inversely, the absorption spectra of BODIPYs **3** and **6** lack of any significant absorption intensity in the region from 460 to 550 nm, thus allowing for selective excitation of the gallium-corrole donor chromophore for the examination of ET processes from gallium-corrole to blue-BODIPY.

Table 1. UV-vis Absorption data in 2-MeTHF at 298 K.

dye	λ_{abs} (max) (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)				
	298 K			77 K	
	Corrole Soret band	Corrole Q Bands	BODIPY S_1 Band	Corrole Q Bands	BODIPY S_1 Band
1	418 (206)	532 (8.69) 566 (12.7) 599 (27.1)	-	529 557, 570 605, 619	-
2	-	-	525 (89.5)	-	492, 526
3	-	-	654 (92.8)	-	614, 674
4	419 (104)	566 (7.60) 599 (21.9)	525 (59.2)	-	-
5	419 (164)	566 (16.8) 607 (40.7)	653 (66.6)	-	-
6	-	-	654 (85.1)	-	612, 670
7	-	-	587 (81.2)	-	550, 597
8	419 (109)	567 (32.2) 606 (34.5)	657 (47.2)	-	-
9	419 (137)	-	591 (81.5)	-	-

Steady-state fluorescence spectroscopy and lifetimes. Figure 2 shows the absorption, fluorescence and excitation spectra of gallium-corrole **1** and of the unfunctionalized (red),

mono- (green) and distyryl- (blue) BODIPYs precursors **2**, **7** and **3**. These spectra show that the introduction of conjugated styryl substituent on BODIPY induces a bathochromic shift of the absorption and fluorescence bands. Gallium-corrole **1** exhibits a strong fluorescence band at 612 nm and a weaker vibronic shoulder at 670 nm. The fluorescence quantum yield is 0.11. The BODIPYs **2**, **3**, **6** and **7** display an intense emission band at 543, 681, 684 and 603 nm, respectively.

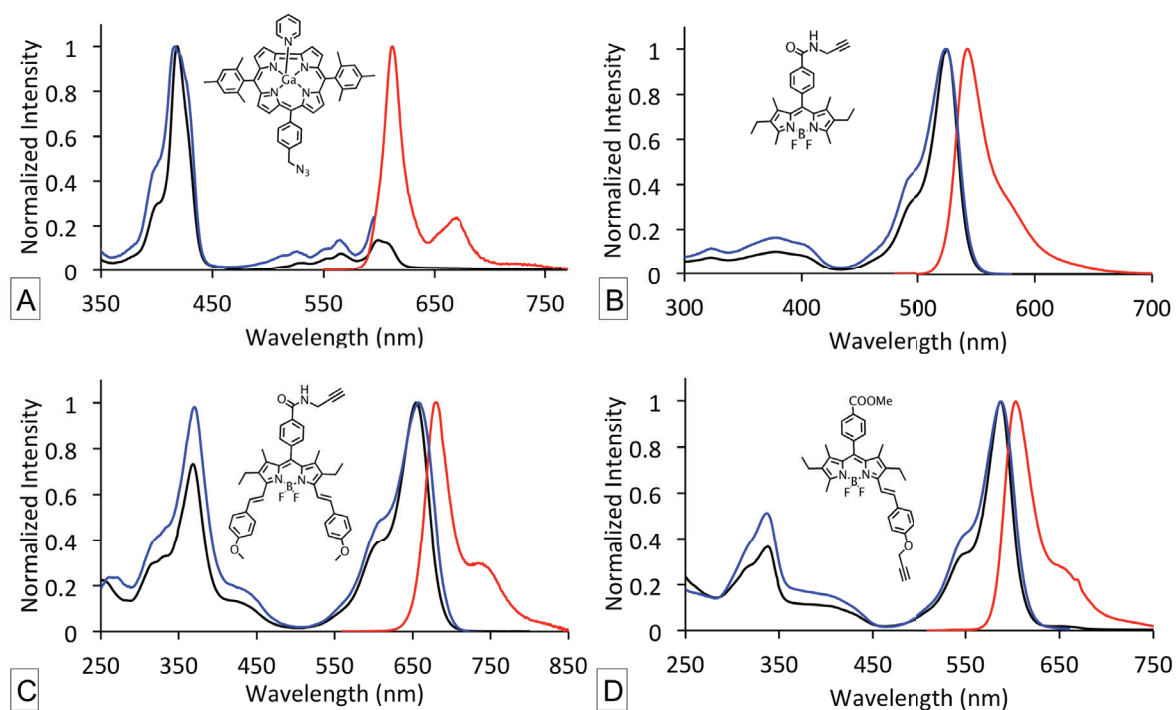


Figure 2. Absorption (black), emission (red), and excitation (blue) spectra of gallium-corrole **1** (A, $\lambda_{\text{ex}} = 540$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 650$ nm), and BODIPYs **2** (B, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm), **3** (C, $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 750$ nm), and **7** (D, $\lambda_{\text{ex}} = 510$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 670$ nm) in 2-MeTHF at 298 K.

Figure 3 shows the absorption, fluorescence and excitation spectra of the bichromophoric species **4**, **5**, **8** and **9**. Each dyad displays a fluorescence band near 612 nm readily attributable to the fluorescence of the gallium(III)-corrole unit and a luminescence band due to the BODIPY moiety either placed at higher energy (for **4**; 540 nm) or at lower energies (for **5** and **8**; 675 and 676 nm, respectively) depending on the number of styryl groups present. For compound **9**, only one band is observed at 603 nm attributed to both the BODIPY and gallium(III)-corrole units (*i.e.* strong fluorescence superposition). Based on the fluorescence positions, the BODIPY chromophore can act as an energy donor (such as in **4**) and the energy acceptor (such as in **5** and **8**). In compound **9**, this role is not well defined when only based on these spectra.

The excitation spectra of the arrays exhibit a perfect match with the absorption, confirming the efficient energy between the two chromophores, following an excitation of

the donor. However, the presence of two emission bands for the arrays (one for the corrole and one for the BODIPY) indicates that a part of the energy of the donor is not transferred to the acceptor, generating a residual emission attributed to the donor (cf Figure 3).

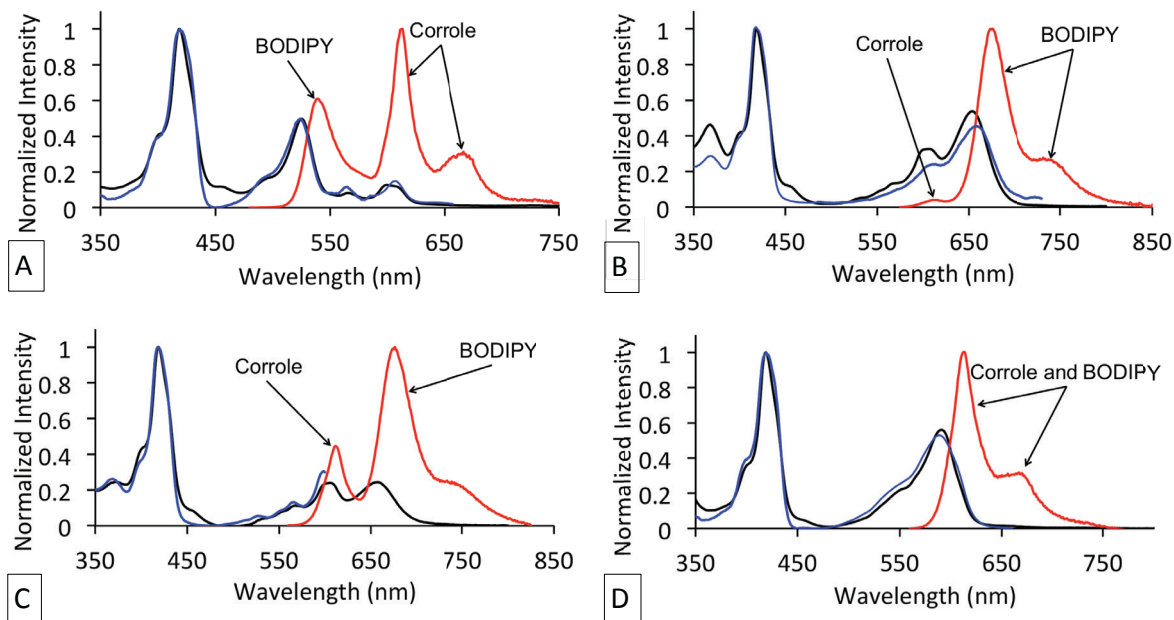


Figure 3. Absorption (black), emission (red), and excitation (blue) spectra of dyad **4** (A, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 670$ nm), and **5** (B, $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 740$ nm), **8** (C, $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 670$ nm), and **9** (D, $\lambda_{\text{ex}} = 510$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 670$ nm) in 2-MeTHF at 298 K.

The fluorescence data of all compounds at 298 and 77 K are summarized in Tables 2 and 3. The model BODIPY compounds **2**, **3**, **6** and **7** exhibit high fluorescence quantum yields, Φ_F , ranging between 0.42 for **3** and 0.76 for **7**. The fluorescence lifetimes, τ_F , range from 4.64 ns for **2** to 7.03 ns for **3**. Gallium(III)-corrole **1** displays a lower Φ_F (*i.e.* $\Phi_F = 0.11$, $\tau_F = 2.17$ ns) with respect to BODIPY, consistent with the literature.²³ The Φ_F values of the dyads were determined using an excitation wavelength where the donor absorbs more bearing in mind that singlet-singlet energy transfer may occur and contribute to the observed intensity of the acceptor. However, these Φ_F values turn out to be lower than that of their BODIPY (**3**) and gallium(III)-corrole (**1**) precursors (*i.e.* 0.016 for **8** and 0.093 for **5**) indicating that some additional non-radiative processes occur, namely internal conversion (k_{ic}) $S_1 \rightarrow S_0$.

Table 2. Fluorescence quantum yields, Φ_F , and emission maxima.

dye	Φ_F	$\lambda_{em} (max) (nm)$			
		298 K		77 K	
		Corrole	BODIPY	Corrole	BODIPY
1	0.11 ^b	612, 670		616, 671	
2	0.59 ^a		543		539, 569
3	0.42 ^c		681		696, 750
4	0.036 ^{a, d}	613, 667	540	616, 671	534, 565
5	0.093 ^{c, d}	613	675	608	680, 744
6	0.44 ^c		684		689, 744
7	0.76 ^b		603		611, 655
8	0.016 ^{c, d}	611	676	610	678, 742
9	0.082 ^{b, d}	613, 667		611, 668	651

The quantum yields, Φ_F , were measured in 2-MeTHF at 298 K, using rhodamine 6G^a ($\Phi_F = 0.94$ in methanol), cresyl violet^b ($\Phi_F = 0.54$ in methanol) and rhodamine 101^c ($\Phi_F = 1.00$ in methanol) as references.^{10-11, 24} All Φ are corrected for changes in refractive index.¹³ ^dTotal quantum yield (BODIPY and corrole).

Table 3. Fluorescence lifetimes, τ_F , in 2-MeTHF.

dye	298 K				77 K		
	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	τ_{F1} (ns) (rel. int.)	τ_{F2} (ns) (rel. int.)	λ_{em} (nm)	τ_{F1} (ns) (rel. int.)	τ_{F2} (ns) (rel. int.)
1	527	612	2.2 ± 0.1	-	619	3.2 ± 0.1	-
2	470	543	4.6 ± 0.1	-	540	9.7 ± 0.3	-
3	550	681	6.3 ± 0.1	-	695	12.1 ± 0.3	-
4	470	540	0.7 ± 0.3 (0.52)	3.0 ± 0.1 (0.48)	534	1.7 ± 0.4 (0.71)	4.5 ± 0.6 (0.29)
		613	1.9 ± 0.1	-	615	2.6 ± 0.1	-
5	550	611	0.2 ± 0.1 (0.87)	1.9 ± 0.1 (0.13)	611	0.5 ± 0.2 (0.68)	3.3 ± 0.1 (0.32)
		675	3.6 ± 0.1	-	679	5.8 ± 0.1	-
6	510	684	7.0 ± 0.1	-	690	11.9 ± 0.4	-
7	510	603	5.4 ± 0.1	-	611	6.8 ± 0.1	-
8	550	611	1.6 ± 0.1	-	610	2.8 ± 0.1	-
		676	3.7 ± 0.2	-	678	5.0 ± 0.1	-
9	510	613	1.8 ± 0.1	-	611	2.6 ± 0.1	-
		667	3.8 ± 0.2	-	666	4.1 ± 0.1	-

The fluorescence lifetimes (τ_F) of each dyad were measured separately at the fluorescence maxima of the gallium-corrole and the BODIPY chromophores at 298 and 77K. Dyad **4** exhibits two emissions from the BODIPY (donor, 540 nm) and the gallium-corrole unit (acceptor, 613 nm; $\tau_F = 1.9 \pm 0.1$ (298K), 2.6 ± 0.1 (77K)). In comparison with the model compound **1** ($\tau_F = 2.2 \pm 0.1$ (298K), 3.2 ± 0.1 (77K)) acting as the acceptor, the slight decrease in τ_F indicates the presence of a small non radiative process associated with the incorporation of the flexible chain also called “loose bolt” effect (which takes part in the internal conversion rate, k_{ic}).²⁵ Its rate can be approximated by $k_{LB} = (1/\tau_F(\mathbf{4-“Ga”}) - (1/\tau_F(\mathbf{1}))) \sim 7.2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ where $\tau_F(\mathbf{4-“Ga”})$ is the fluorescence lifetime of the acceptor chromophore (*i.e.* gallium-corrole) and $\tau_F(\mathbf{1})$ is the lifetime of the gallium-corrole model compound. This estimation is relevant with regard to the added uncertainties in the evaluation of the slower rates of energy transfers below. Concurrently, the fluorescence decay of the BODIPY residue is biphasic in **4** (τ_F (in ns) = 0.7 ± 0.3 (52%) and 3.0 ± 0.1 (48%) at 298K; 1.7 ± 0.4 (71%) and 4.5 ± 0.6 (29%) at 77K) which are both shorter than that measured for the BODIPY-containing model compound **2** ($\tau_F = 4.6 \pm 0.1$ (298K) and 9.7 ± 0.3 (77K)). The short component is clearly faster than that for **2** by ~ 6 -7 folds and is consistent with the presence of an efficient energy transfer process (BODIPY* \rightarrow gallium-corrole). This efficiency of energy transfer can be obtained from $ET_{eff} = ((1/\tau_F) - (1/\tau_F^o)) / (1/\tau_F)$ and the data are placed in Table 4. This value is in the order of 85 and 82% at 298 and 77K, respectively, in this case. The presence of a second

component suggests that at least two conformations exist in solution associated with the possible folding and unfolding of the flexible chain. The possibility that the “loose bolt” effect contributes to the decrease in τ_F exists but the calculated rate ($1/\tau_F(\mathbf{4}\text{-“BODIPY”}) - (1/\tau_F(\mathbf{2}))$) where $\tau_F(\mathbf{4}\text{-“BODIPY”})$ is the lifetime of the slow component of the BODIPY fluorescence decay gives a value ($\sim 1.2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$) that is only ~ 2 folds larger than the k_{LB} evaluated for the gallium-corrole chromophore in **4** (i.e. $\sim 7.2 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$). Similarly, dyad **5** exhibits a blue-BODIPY acting as the energy acceptor with τ_F (in ns) = 3.6 ± 0.1 (298K) and 5.8 ± 0.1 (77K). These values are also shorter than that for the model compound **3** (τ_F (in ns) = 6.3 ± 0.1 and 12.1 ± 0.3). The estimated k_{LB} 's are 1.2×10^8 (298K) and $0.9 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ (77K). This qualitative analysis indicates that the contribution of k_{LB} in the dyads ranges from $\sim 0.7 \times 10^8$ to $\sim 1.2 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ and the conclusion is that the apparent deactivation rates evaluated for slow processes are most likely composed of two contributions, namely k_{ET} (rate of energy transfer) and k_{LB} , and may be of comparable sizes. Table 3 summarizes all the τ_F data and can be separated into two categories: the flexible chain is placed near (**2-5**) or far (**6-9**) from the BF_2 unit. The main reason for this separation is that the fluorescence decays of the donor exhibit a double exponential for compounds **4** and **5** (presumably due to a chain folding) but not in dyads **8** and **9**. The flexible chains in these two series slightly differ by the presence of a $(\text{C=O})\text{NH}$ in the former sets instead of a -O- link used in the second series.

Singlet energy transfer rates. The rate for energy transfer (i.e. k_{ET}) for each dyad was evaluated using the τ_F data placed in Table 3. The k_{ET} values are calculated using eq 1:

$$k_{ET} = \left(\frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_F^0} \right) \quad (1)$$

where τ_F^0 and τ_F are respectively the fluorescence lifetimes of donor in the absence and presence of an acceptor. Thus, these values are extracted from the model compounds (**2**, **3**, **6**, and **7**) and dyads (**4**, **5**, **8**, **9**), respectively. This method is more accurate than measuring the Φ_F values for strongly overlapping fluorescence and absorption spectra as both the area under the corrected fluorescence spectrum and exact absorbance of the donor chromophore are not accessible with enough precision. The k_{ET} values are summarized in Table 4 and the values marked with * indicate that the value is most likely mixed with the “loose bolt” effect, k_{LB} , and consequently the only reliable conclusion is that the energy transfer process is either inexistent or too slow to reliably access k_{ET} .

Table 4. Energy transfer rates, k_{ET} , calculated with eq. 1 (2-MeTHF).^a

D*→A	k_{ET} (10^8 s ⁻¹)	
	298 K	77 K
4 (red-BODIPY* → Cor)	12 (85%) 1.2 (35%)*	4.9 (82%) 1.2 (54%)*
5 (Cor* → blue-BODIPY)	45 (91%) 0.7 (13%)*	17 (84%) no transfer
8 (Cor* → blue-BODIPY)	1.7 (27%)*	0.4 (13%)*
9 (green-BODIPY*→Cor)	0.8 (30%)*	1.0 (40%)*
(Cor*→green-BODIPY)	1.0 (18%)*	0.4 (12%)*

^a Cor = gallium-corrole chromophore. The values marked by a star indicate that they are most likely mixed with the “loose bolt” effect. No reliable value for k_{ET} can be extracted.

Singlet energy transfer analysis. The Förster theory²⁶ is used to interpret the experimental k_{ET} 's of the dyads **4**, **5**, **8**, and **9**. The calculated rates of energy transfer are obtained using eq 2:

$$k_{ET} = \frac{8.8 \times 10^{-25} \kappa^2 k_F^0(D) \cdot \mathbf{J}}{n^4 r^6} \quad (2)$$

where $k_F^0(D) = \Phi_F^0/\tau_F^0$, $k_F^0(D) = \phi_F^0/\tau_F^0$ with $\Phi_F^0\phi_F^0$ being the fluorescence quantum yield of the donor in the absence of the acceptor, r is the center-to-center donor-acceptor separation, n is the refractive index of the solvent (here 1.406), κ^2 is an orientation factor describing the relative orientation of the electronic dipole moments of the associated transitions of the donor and acceptor ($\kappa^2 = (\sin\theta_D\sin\theta_A\cos\phi - 2\cos\theta_D\cos\theta_A)^2$; where θ_D and θ_A are the angles made by the donor-acceptor vector with the transition moment vector of the donor and acceptor, respectively). For both BODIPY and gallium-corrole units, the transition moment is oriented along the center of the chromophore towards C_{meso} . \mathbf{J} is the spectral overlap ($\int F_D(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda / \int F_D(\lambda) d\lambda$, in mmol⁻¹ cm⁶, also called the \mathbf{J} integral) of the donor fluorescence spectra ($F_D(\lambda)$) and the acceptor absorption profile ($\epsilon_A(\lambda)$). Figure 4 overlays the fluorescence spectra of the donors with the absorption spectra of the acceptors of the necessary model compounds building the dyads. For **9**, the proximity of the absorption and fluorescence bands for both units makes \mathbf{J} non-nil for both directions and should be considered.

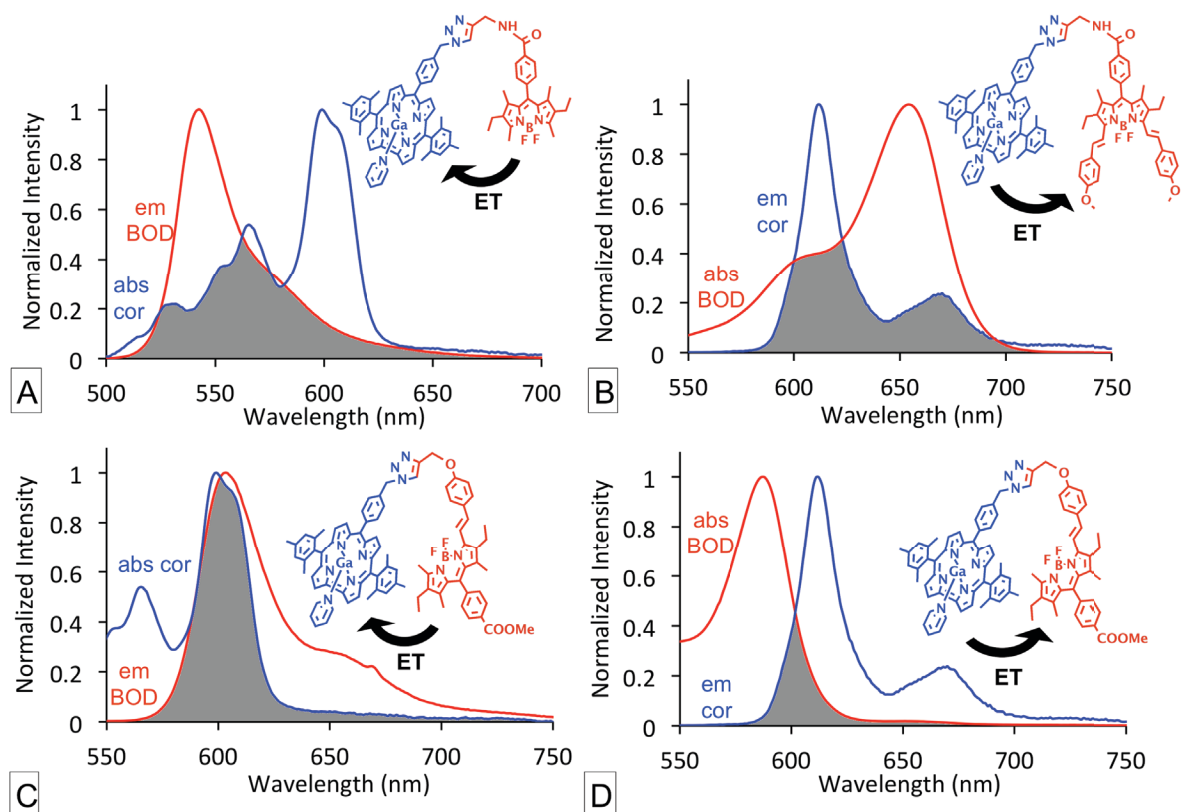


Figure 4. Superposition of the normalized (A) absorption spectrum of **1** (ϵ : 27100 M⁻¹cm⁻¹) with the fluorescence band of **2**, (B) absorption spectrum of **3** (ϵ : 92800 M⁻¹cm⁻¹) with the fluorescence band of **1**, (C) absorption spectrum of **1** (ϵ : 27100 M⁻¹cm⁻¹) with the fluorescence band of **7**, and (D) absorption spectrum of **7** (ϵ : 81200 M⁻¹cm⁻¹) with the fluorescence band of **1**, all spectra in 2-MeTHF at 298K. The absorption and fluorescence spectra of the BODIPYs and gallium-corrols are respectively in red and blue. The overlaps are shaded in gray. Note that the folded conformation drawn for the dyads is only to make them fit within the graphs.

The calculated values of J , $k_F^\circ(D)$, structural parameters (r , ϕ , θ_D , θ_A), $k_{ET}(cal)$ and $k_{ET}(exp)$ for dyads **4**, **5** and **9** (both directions) are placed in Table 5. In the absence of X-ray structures, structural parameters were extracted from DFT calculations (B3LYP; geometry optimizations placed in Figure 1). The J values compare favorably to that recently reported for a pyrene-BODIPY dyad (Figure 5).²⁷ The calculated k_{ET} values are ~ 2 to ~ 30 times larger than the experimental ones for **4** and **5**. For compound **9**, this ratio is larger but unreliable. This situation is not uncommon as it has been encountered before where a ratio $k_{ET}(cal)/k_{ET}(exp)$ between 11 to 31 was noted.²⁸ The main reason for this is that the Förster approach is considered an approximation.²⁹ Nonetheless, comparisons are still possible.

Table 5. $k_F^\circ(D)$, $k_{ET}(cal)$ and $k_{ET}(exp)$ for dyads **4**, **5** and **9** (both directions) at 298 K.^{a-d}

ET direction	θ_A (°)	θ_D (°)	ϕ (°)	κ^2	r (Å)	$k_{ET}(cal)$ ($10^8 s^{-1}$)	$k_{ET}(exp)$ ($10^8 s^{-1}$)	$\frac{k_{ET}(cald)}{k_{ET}(exp)}$
$k_F^\circ = 1.28 \times 10^8 s^{-1}$ $J = 2.7 \times 10^{-14}$								
4B red-BODIPY*→Cor	129.6	134.3	19.6	0.2	17.9	47	12	3.9
4C red-BODIPY*→Cor	55.7	120.5	67.7	1.5	18.7	272	12	23
4D red-BODIPY*→Cor	88.0	97.3	58.1	0.3	21.1	26	12	2.2
4E red-BODIPY*→Cor	57.4	119.0	56.8	1.8	19.0	298	12	25
$k_F^\circ = 0.50 \times 10^8 s^{-1}$ $J = 34 \times 10^{-14}$								
5B Cor*→blue-BODIPY	129.6	134.3	19.6	0.2	17.9	231	45	5.1
5C Cor*→blue-BODIPY	55.7	120.5	67.7	1.5	18.7	1338	45	30
5D Cor*→blue-BODIPY	88.0	97.3	58.1	0.3	21.1	128	45	2.8
5E Cor*→blue-BODIPY	57.4	119.0	56.8	1.8	19.0	1465	45	32
$k_F^\circ = 0.67 \times 10^8 s^{-1}$ $J = 5.2 \times 10^{-14}$								
9B green-BODIPY*→Cor	82.7	95.0	81.5	0.03	16.5	12	0.8*	15*
9C green-BODIPY*→Cor	98.9	148.0	50.3	0.1	17.5	27	0.8*	34*
9D green-BODIPY*→Cor	56.9	113.4	26.2	2.4	22.3	153	0.8*	190*
9E green-BODIPY*→Cor	94.2	149.9	32.6	0.4	17.1	125	0.8*	156*
9F green-BODIPY*→Cor	100.0	129.6	27.0	0.3	20.7	30	0.8*	37*
$k_F^\circ = 0.50 \times 10^8 s^{-1}$ $J = 4.1 \times 10^{-14}$								
9B Cor*→green-BODIPY	82.7	95.0	81.5	0.03	16.5	7	1.0*	7*
9C Cor*→green-BODIPY	98.9	148.0	50.3	0.1	17.5	16	1.0*	16*
9D Cor*→green-BODIPY	56.9	113.4	26.2	2.4	22.3	90	1.0*	90*
9E Cor*→green-BODIPY	94.2	149.9	32.6	0.4	17.1	74	1.0*	74*
9F Cor*→green-BODIPY	100.0	129.6	27.0	0.3	20.7	18	1.0*	18*

- a) Cor = gallium-corrole chromophore; cal = calculated, exp = experimental. J is in $mmol^{-1}cm^6$.
b) $k_F^\circ(D) = \Phi_F(D)/\tau_F(D)$; these data are from Tables 2 and 3, respectively.
c) The κ^2 and r values result from the DFT computations (optimized geometries; Figure 1).
d) The values marked with a star are unreliable due to the “loose bolt” effect (see text).

One important issue is that the relative size of both $k_{ET}(exp)$ and $k_{ET}(cal)$ between **4** and **5** (same flexible chain) and **9** (two directions, so same flexible chain) follow the same relative trend. Indeed, both $k_{ET}(cal)$ and $k_{ET}(exp)$ are ~5 times larger for compound **5** than those for **4**. This comparison indicates that the dominant parameter for this effect is the J integral, which is ~10 times larger for **5** by virtue of the larger absorptivity of the acceptor (for **3**, $\epsilon = 92800 M^{-1}cm^{-1}$). For **9**, both $k_{ET}(cald.)$ and $k_{ET}(exp.)$ are larger for the green-BODIPY*→Cor process than that for Cor*→green-BODIPY. In this case, both $k_F^\circ(D)$ and J contribute to the larger size of k_{ET} . It is also interesting to note that the $k_{ET}(cal)$ values for **4** and **5** falls into two groups, slow and fast rates where ~one order of magnitude separates the two groups. This observation corroborates well with the presence

of two τ_F 's (i.e. two k_{ET} 's) in these case, suggesting that two families of conformations provide similar rates namely directed by κ^2 .

However, one issue needs to be addressed. The k_{ET} values for the recently reported pyrene-BODIPY dyad (Figure 5) is faster by 1 to 2 orders of magnitude than those reported here.²⁷ The authors assumed (based on the *Förster* theory) that the center-to-center distance is 20 Å (similar to the unfolded conformations investigated here), which is the distance between the center of pyrene and the center of BODIPY. However, the pyrene unit is conjugated all the way to the triazole linker (i.e. N-phenyl position) and so the effective distance is much shorter than 20 Å. Indeed, by changing 20 by 9.6 Å in equation 2, the calculated k_{ET} increases by 2 orders of magnitude. Moreover, a relationship between the C_{meso} - C_{meso} distance (not center-to-center) and k_{ET} was demonstrated for a series of cofacial bisporphyrins,³⁰ and that any atom or group placed exactly between the closest positions (i.e. closest carbons) between the donor and the acceptor slowed down the energy transfer process.³¹ The selection of the correct r value turns out to be a difficult task. In addition, the Dexter mechanism can also contribute to the overall process for this pyrene-BODIPY (Figure 5). Consequently, $k_{ET}(\text{total})$ can be the sum of both contributions; i.e. *Förster* and Dexter, and this despite unfavorable dihedral angles between the phenyl group and the donor and acceptor moieties. This phenomenon where unfavorable dihedral angles are present and yet efficient energy transfers occur, was recently demonstrated by us for truxene-containing polyporphyrin dyads.³² The obvious absence of conjugation in the compounds investigated in this work and the large donor-acceptor separations (avoiding any orbital overlap) preclude this mechanism. Considering these parameters, then k_{ET} for dyads **4**, **5**, **8**, and **9** are bound to be significantly slower than that reported for the pyrene-BODIPY dyad of Figure 5.

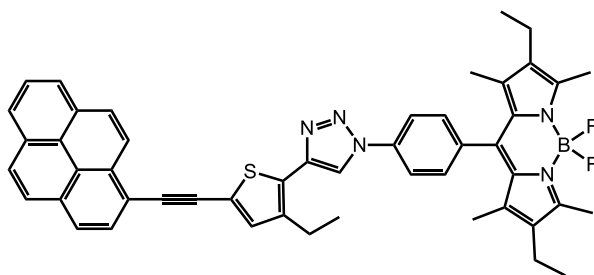


Figure 5. Structure of the recently investigated dyad pyrene-BODIPY.

Conclusion

Dyads incorporating various types of BODIPY chromophores, here called red, green and blue, and gallium-corroles have been synthesized in good yields using the “*click chemistry*”. The direction of the singlet energy transfer, gallium-corrole* \rightarrow BODIPY or BODIPY* \rightarrow gallium-corrole, can be modulated depending

whether no, one or two styryl groups are attached to the BODIPY moiety. In one case, both directions were found possible based upon the non-nil spectral overlap of the donor emission and acceptor absorption (*i.e.* J integral of the *Förster* theory). The qualitative analysis of the k_{ET} data using FRET clearly corroborates the presence of conformers in solution where the folded ones are more stable for compounds **4** and **5**, and unfolded for compound **9**, which uses slightly different flexible chains. The size of the J integral plays a key role on the size of k_{ET} .

Acknowledgements

The “*Centre National de la Recherche Scientifique*” (ICMUB, UMR CNRS 6302) is gratefully thanked for financial support. Support was provided by the CNRS, the “*Université de Bourgogne*” and the “*Conseil Régional de Bourgogne*” through the 3MIM integrated project (“*Marquage de Molécules par les Métaux pour l’Imagerie Médicale*”). BB thanks the French Ministry of Research for PhD grants. PDH thanks the “*Agence Nationale de la Recherche (ANR)*” and the Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for financial support. Fanny Chaux, Marie José Penouilh, Philippe Richard, Nicolas Maindron and Marc Pirrotta are warmly acknowledged for technical support.

Supporting Information

Comparison of absorbance and emission spectra of compounds **2**, **7** and **3**. ^1H NMR spectra, mass spectra and superposition of absorption, emission and excitation spectra of each compound.

References

1. (a) Bandi, V.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S.; D'Souza, F., *Chem. Commun.* **2013**, 49 (28), 2867-2869; (b) Lee, C. Y.; Hupp, J. T., *Langmuir* **2010**, 26 (5), 3760-3765; (c) Leonardi, M. J.; Topka, M. R.; Dinolfo, P. H., *Inorg. Chem.* **2012**, 51 (24), 13114-13122.
2. Shao, W.; Wang, H.; He, S.; Shi, L.; Peng, K.; Lin, Y.; Zhang, L.; Ji, L.; Liu, H., *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116 (49), 14228-14234.
3. (a) Barbe, J. M.; Canard, G.; Brandès, S.; Guillard, R., *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 21, 4601-4611; (b) El Ojaimi, M.; Gros, C. P.; Barbe, J.-M., *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 7, 1181-1186; (c) Gros, C. P.; Barbe, J.-M.; Espinosa, E.; Guillard, R., *Angew. Chem. Int. Ed. (VIP Communication)* **2006**, 45, 5642-5645; (d) Guillard, R.; Gros, C. P.; Barbe, J.-M.; Espinosa, E.; Jérôme, F.; Tabard, A.; Shao, J.; Ou, Z. P.; Latour, J.-M.; Kadish, K. M., *Inorg. Chem.* **2004**, 43, 7441-7455; (e) Guillard, R.; Gros, C. P.; Bolze, F.; Jérôme, F.; Ou, Z. P.; Shao, J. G.; Fischer, J.; Weiss, R.; Kadish, K. M., *Inorg.*

- Chem.* **2001**, *40* (19), 4845-4855; (f) Guillard, R.; Jérôme, F.; Barbe, J. M.; Gros, C. P.; Ou, Z. P.; Shao, J.; Fischer, J.; Weiss, R.; Kadish, K. M., *Inorg. Chem.* **2001**, *40* (19), 4856-4865; (g) Jérôme, F.; Gros, C. P.; Tardieux, C.; Barbe, J.-M.; Guillard, R., *Chem. Commun.* **1998**, 2007-2008; (h) Kadish, K. M.; Ou, Z. P.; Shao, J.; Gros, C. P.; Barbe, J.-M.; Jérôme, F.; Bolze, F.; Burdet, F.; Guillard, R., *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 3990-4005; (i) Kadish, K. M.; Shao, J.; Ou, Z. P.; Gros, C. P.; Bolze, F.; Barbe, J.-M.; Guillard, R., *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4062-4070.
4. (a) Agadjanian, H.; Ma, J.; Rentsendorj, A.; Valluripalli, V.; Hwang, J. Y.; Mahammed, A.; Farkas, D. L.; Gray, H. B.; Gross, Z.; Medina-Kauwe, L. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106* (15), 6105-6110; (b) Hwang, J. Y.; Lubow, D. J.; Sims, J. D.; Gray, H. B.; Mahammed, A.; Gross, Z.; Medina-Kauwe, L. K.; Farkas, D. L., *J. Biomed. Opt.* **2012**, *17* (1), 015003; (c) Lim, P.; Mahammed, A.; Okun, Z.; Saltsman, I.; Gross, Z.; Gray, H. B.; Termini, J., *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25* (2), 400-409; (d) Shi, L.; Jiang, H.-F.; Yin, W.; Wang, H.-H.; Wang, H.; Zhang, L.; Ji, L.-N.; Liu, H.-Y., *Wuli Huaxue Xuebao* **2012**, *28* (2), 465-469.
 5. (a) Liu, X.; Tripathy, U.; Bhosale, S. V.; Langford, S. J.; Steer, R. P., *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (38), 8986-8998; (b) Weaver, J. J.; Sorasaene, K.; Sheikh, M.; Goldschmidt, R.; Tkachenko, E.; Gross, Z.; Gray, H. B., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2004**, *8* (1-3), 76-81.
 6. Aviv, I.; Gross, Z., *Chem. Commun.* **2007**, (20), 1987-1999.
 7. (a) Bendix, J.; Dmochowski, I. J.; Gray, H. B.; Mahammed, A.; Simkhovich, L.; Gross, Z., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39* (22), 4048-4051; (b) Simkhovich, L.; Goldberg, I.; Gross, Z., *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80* (3-4), 235-238.
 8. Brizet, B.; Eggenspiller, A.; Gros, C. P.; Barbe, J. M.; Goze, C.; Denat, F.; Harvey, P. D., *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (7), 3646-3650.
 9. Eggenspiller, A.; Takai, A.; El-Khouly, M. E.; Ohkubo, K.; Gros, C. P.; Bernhard, C.; Goze, C.; Denat, F.; Barbe, J. M.; Fukuzumi, S., *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116* (15), 3889-3898.
 10. Baumler, W.; Penzkofer, A., *Chem. Phys.* **1990**, *140*, 75-97.
 11. Magde, D.; Brannon, J. H.; Cremers, T. L.; Olmsted, J., III, *J. Phys. Chem.* **1979**, *83* (6), 696-699.
 12. Brouwer, A. M., *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (12), 2213-2228.
 13. Schäfer, F. P., *Topics in Applied Physics: Structure and Properties of Laser Dyes*. Springer-Verlag: Berlin, 1990; Vol. 1.
 14. Lide, D. R., *Handbook of Chemistry and Physics*. Chemical Rubber Publishing Co: Berlin, 1957.
 15. Frisch, M. J. *et al. Gaussian, Inc.*, Wallingford CT, 2004.
 16. (a) Bauernschmitt, R.; Ahlrichs, R., *Chem. Phys. Lett.* **1996**, *256*, 454-464; (b) Becke, A. D., *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652; (c) Casida, M. E.; Jamorski, C.; Casida, K. C.; Salahub, D. R., *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 4439-4449; (d) Hohenberg, P.; Kohn, W., *Phys. Rev.* **1964**, *136*, B864-871; (e) Hohenberg, P.; Kohn, W., *J. Phys. Rev.* **1965**, *140*, A1133-1138; (f) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., *Phys. Rev. B* **1988**,

- 37, 785–789; (g) Miehllich, B.; Savin, A.; Stoll, H.; Preuss, H., *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *157*, 200–206; (h) Parr, R. G.; Yang, W., *Density-functional theory of atoms and molecules*. Oxford Univ. Press: Oxford, 1989; (i) Salahub, D. R.; Zerner, M. C., *The Challenge of d and f Electrons*. Amer. Chem. Soc. : Washington, D.C. , 1989; (j) Stratmann, R. E.; Scuseria, G. E.; Frisch, M. J., *J. Chem. Phys.* **1998**, *109*, 8218–8224.
17. (a) Binkley, J. S.; Pople, J. A.; Hehre, W. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 939–947; (b) Dobbs, K. D.; Hehre, W. J., *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 359–378; (c) Dobbs, K. D.; Hehre, W. J., *J. Comput. Chem.* **1987**, *8*, 861–879; (d) Dobbs, K. D.; Hehre, W. J., *J. Comput. Chem.* **1987**, *8*, 880–893; (e) Gordon, M. S.; Binkley, J. S.; Pople, J. A.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2797–2803; (f) Pietro, W. J.; Francl, M. M.; Hehre, W. J.; Defrees, D. J.; Pople, J. A.; Binkley, J. S., *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5039–5048.
 18. (a) Kondo, M.; Furukawa, S.; Hirai, K.; Kitagawa, S., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 5327–5330. (b) Kolemen, S.; Bozdemir, O. A.; Cakmak, Y.; Barin, G.; Erten-Ela, S.; Marszalek, M.; Yum, J.-H.; Zakeeruddin, S. M.; Nazeeruddin, M. K.; Graetzel, M.; Akkaya, E. U. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 949–954.
 19. Saltsman, I.; Mahammed, A.; Goldberg, I.; Tkachenko, E.; Botoshansky, M.; Gross, Z., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (25), 7411–20.
 20. (a) Fan, J.; Hu, M.; Zhan, P.; Peng, X., *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 29–43; (b) Dost, Z.; Atilgan, S.; Akkaya, E. U., *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8484–8488; (c) Zhang, X. L.; Xiao, Y.; Qian, X. H., *Org. Lett.* **2008**, *10*, 29–32.
 21. (a) Garcia, G.; Naud-Martin, D.; Carrez, D.; Croisy, A.; Maillard, P., *Tetrahedron* **2011**, *67* (26), 4924–4932; (b) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Edit.* **2001**, *40* (11), 2004–2021; (c) Lahann, J., *Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science*. Wiley: Chichester, West Sussex, 2009; (d) Locos, O. B.; Heindl, C. C.; Corral, A.; Senge, M. O.; Scanlan, E. M., *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, (6), 1026–1028.
 22. Takai, A.; Chkounda, M.; Eggenspieler, A.; Gros, C. P.; Lachkar, M.; Barbe, J.-M.; Fukuzumi, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4477–4489.
 23. Weaver, J. J. *PhD Thesis*. California Institute of Technology, Pasadena (USA), 2005.
 24. Drexhage, K. H., *J. Res. Natl. Bur. Stand. A, Phys. Chem.* **1976**, *80*, 421–428.
 25. Berezin, M. Y.; Achilefu, S., *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641–2684.
 26. Förster, T., *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55–75.
 27. Bai, D.; Benniston, A. C.; Hagon, J.; Lemmetyinen, H.; Tkachenko, N. V.; Harrington, R. W., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 9854–9861.
 28. Cho, H. S.; Jeong, D. H.; Yoon, M.-C.; Kim, Y.-H.; Kim, Y.-R.; Kim, D.; Jeong, S. C.; Kim, S. K.; Aratani, N.; Shinmori, H.; Osuka, A., *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 4200.
 29. (a) Beljonne, D.; Curutchet, C.; Scholes, G. D.; Silbey, R. J., *J. Phys. Chem. B* **2009**, (113), 6583–6599; (b) Curutchet, C.; Mennucci, B.; Scholes, G. D.; Beljonne, D., *J. Phys. Chem. B*, **2008**, *112*, 3759–3760; (c) Khan, Y. R.; Dykstra, T. E.; Scholes, G.

- D., *Chem. Phys. Let.* **2008**, *461*, 305-309; (d) Scholes, G. D., *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **2003**, *54*, 57-87.
30. Faure, S.; Stern, C.; Guillard, R.; Harvey, P. D., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1253-1261.
31. (a) Gros, C. P.; Aly, S. M.; El Ojaimi, M.; Barbe, J.-M.; Brisach, F.; Abd-El-Aziz, A. S.; Harvey, P. D., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2007**, *11* (3-4), 244-257; (b) Gros, C. P.; Brisach, F.; Meristoudi, A.; Espinosa, E.; Guillard, R.; Harvey, P. D., *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 125-135.
32. Langlois, A.; Xu, H.-X.; Brizet, B.; Denat, F.; Barbe, J.-M.; Gros, C. P.; Harvey, P. D., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2013**, DOI: 10.1142/S1088424613501150, in press.

3.3 Discussion générale

La méthode de « chimie click » a permis la synthèse, avec de bons rendements de réaction, de quatre systèmes BODIPY-corolle de gallium, dont un système BODIPY-biscorolle. Notons que les systèmes **4** et **8** associant un BODIPY distyryle à un ou deux corrolles de gallium respectivement sont, à notre connaissance, les premiers systèmes d'antenne dans lesquels le corrole joue le rôle de donneur d'énergie. Par ailleurs c'est le composé **5** qui présente la plus haute valeur de constante de vitesse de transfert d'énergie k_{ET} (4.5 ns^{-1} à 298K). Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle des systèmes présentés dans l'introduction à l'article IV, alors que le bras espaceur reliant le BODIPY au corrole de gallium n'est pas conjugué.

Concernant les corrélations entre les valeurs expérimentales et théoriques de K_{ET} , il faut considérer plusieurs points importants :

Les calculs DFT réalisés sur les composés **4**, **5** et **9** ont permis de donner une estimation de la distance interchromophorique (r), ainsi que du facteur d'orientation relative des dipôles κ^2 . Cependant, le bras espaceur dans ces trois composés sont relativement flexibles (ils comportent tous deux motifs $-\text{CH}_2-$), ce qui autorise un nombre d'autant plus élevé de configurations spatiales possibles. C'est pourquoi nous avons calculé les valeurs de k_{ET} théoriques pour chacune des configurations stables que nous avons déterminées pour chacun des composés **4**, **5** et **9** (Table 1). Une rigidification du bras espaceur permettrait de sélectionner un nombre plus restreint de configurations stables, et donc de valeurs théoriques de k_{ET} . Elle pourrait également permettre d'augmenter le rendement ainsi que la vitesse de transfert d'énergie.

Ajoutons que la fonction ester méthylique portée par la position *meso* du BODIPY dans les composés **8** et **9** pourrait permettre l'introduction de carbocycles (naphtalène, anthracène, pyrène...) et de favoriser ainsi l'absorption dans la région UV et le transfert d'énergie vers le BODIPY.

Contributions à l'article IV.

La synthèse des différents composés a été réalisée à l'Université de Bourgogne, en collaboration avec le groupe de Jean-Michel Barbe et Claude Gros. J'ai synthétisé les différents BODIPY, tandis que Nicolas Desbois et Adrien Dubois ont réalisé la synthèse du corrole de gallium et les réactions « *chimie-click* » permettant d'accéder aux différentes dyades BODIPY-corrole. Pierre Harvey, Nicolas Desbois, Antoine Bonnot, Adam Langlois, Claude Gros et Christine Goze ont participé à l'interprétation des résultats.

J'ai réalisé les études photophysiques des différents composés à l'Université de Sherbrooke.

Avec Antoine Bonnot et Adam Langlois, nous avons réalisé les optimisations de géométrie et les différents calculs théoriques présentés dans ce chapitre.

Concernant la rédaction de l'article IV, j'ai participé à la rédaction des différentes parties du manuscrit, avec une contribution principale pour la partie « synthèse », « résultats photophysiques », et pour le « supporting information ». Les différents co-auteurs ont également participé à la rédaction, et à la correction de l'article.

4 Conclusion du chapitre III

Les travaux présentés dans l'article III et l'article IV décrivent la synthèse de plusieurs systèmes donneur-accepteur (aussi appelés antennes) à base de BODIPY. Les études photophysiques menées sur ces composés, ainsi que sur les précurseurs ayant servi pour leur synthèse ont permis de caractériser le transfert d'énergie photoinduit dans ces différents systèmes. L'introduction de groupements styryles sur le cœur du BODIPY permet de décaler ses domaines d'absorption et d'émission vers le proche infrarouge, et donc de changer son caractère donneur ou accepteur dans le processus de transfert d'énergie. Dans le cas de l'article IV, des valeurs théoriques de k_{ET} ont été calculées, en s'appuyant sur des calculs DFT pour déterminer certains paramètres de l'équation de Förster.

Les valeurs expérimentales de k_{ET} pour ces différents systèmes d'antennes montrent que le transfert d'énergie s'effectue à des échelles de temps allant de la nanoseconde à la centaine de nanosecondes. Ces valeurs sont en accord avec les études de systèmes similaires rapportées dans la littérature. Afin d'augmenter la vitesse de transfert d'énergie, et donc son efficacité, il serait nécessaire de rigidifier les structures, particulièrement les bras espaceurs reliant les différents chromophores entre eux.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce travail de thèse avait pour premier objectif d'élaborer des précurseurs pour l'imagerie bimodale optique/TEP ou TEMP et d'optimiser certaines de leurs propriétés en vue d'applications *in vivo*, notamment l'hydrosolubilité et le domaine d'absorption et d'émission dans la fenêtre thérapeutique.

Plusieurs dérivés de BODIPY fonctionnalisés au niveau de l'atome de bore par formation de liaison B-O ont été synthétisés. Un *O*-BODIPY portant deux groupements de type PEG permettant son hydrosolubilisation a notamment été élaboré. Ce fluorophore conserve de bonnes propriétés de fluorescence en milieu aqueux. Afin d'obtenir des fluorophores possédant des domaines d'absorption et d'émission dans la fenêtre thérapeutique, des groupements styryles ont été introduits en position α -pyrrolique des différents BODIPY élaborés. Ces derniers ont également permis de fonctionnaliser les BODIPY par des groupements tels que l'aniline, diminuant l'hydrophobicité du fluorophore après quaternisation, ou encore des fonctions alcynes utilisables pour fonctionnaliser le cœur BODIPY par des réactions de « *chimie-click* ».

Dans le but de réaliser le radiomarquage du BODIPY au niveau de l'atome de bore, impliquant la substitution d'un atome de fluor 19 par un atome de fluor 18, une série de BODIPY porteurs d'un groupement partant de type DMAP a été mise au point. Certains de ces composés ont été greffés par « *chimie-click* » sur un dérivé de la bombésine, et des tests d'affinité du peptide ont montré que le vecteur conserve une bonne affinité vis-à-vis des récepteurs-cible. De plus, le BODIPY conserve ses propriétés de fluorescence. Nous avons montré que la DMAP résiste à certaines conditions réactionnelles, notamment aux conditions de bioconjugaison. Les tests de fluoration ont permis de déterminer des conditions de fluoration spécifique à l'atome de bore du BODIPY, n'affectant pas le motif peptidique ; confortant ainsi le concept du radiomarquage du BODIPY bioconjugué en dernière étape. Les tests de radiofluoration doivent cependant être réalisés, afin de valider cette approche. Des études précliniques d'imagerie bimodale optique/TEP pourront alors être envisagées.

Le deuxième objectif de ce travail de thèse était la valorisation des BODIPY synthétisés pour l'élaboration de systèmes d'antennes (i.e. chromophores donneurs d'énergie). Des systèmes BODIPY-bisporphyrine, BODIPY-corrole et BODIPY-biscorrole portant des chaînes flexibles ont été synthétisés. Le transfert d'énergie photoinduit au sein de ces composés a été caractérisé par l'étude de leurs données photophysiques, et de celles de leurs précurseurs. Des systèmes dans lesquels le BODIPY est alternativement donneur ou accepteur, selon la présence ou l'absence de groupements styryles sur le BODIPY, ont été obtenus. En utilisant la théorie de Förster, et en s'appuyant sur des paramètres structuraux déterminés par DFT, des constantes théoriques de vitesse de transfert d'énergie ont également été calculées, et comparées

aux résultats expérimentaux. L'utilisation des chaînes flexibles présente des avantages et des inconvénients. Au niveau structural, le nombre de conformations possibles est élevé et rend une analyse précise difficile. Au niveau analytique, la légère diminution de l'intensité de fluorescence par un transfert moyennement efficace, comme dans les systèmes étudiés dans ce travail, permet l'analyse de la fluorescence résiduelle relativement facilement en comparaison à des systèmes donneur-accepteur très efficaces où la fluorescence est totalement ou presque totalement désactivée. Les dérivés obtenus dans ce travail possèdent donc des propriétés spectrales plutôt adaptées à une application pour l'imagerie biomédicale. Cependant, la vitesse du transfert d'énergie (et donc son efficacité) dans ces systèmes pourrait être modulée en jouant sur leur structure. La rigidification de l'espaceur reliant les chromophores pourrait permettre de contrôler plus finement l'efficacité du transfert d'énergie. En effet, la présence, ou l'absence de chaînes flexibles est un paramètre régissant des processus de désactivation de l'état excité concurrents au transfert d'énergie photoinduit. De plus, un bras espaceur rigide permettrait de minimiser le nombre de conformations possibles pour le système, et d'imposer une orientation préférentielle des chromophores les uns par rapport aux autres. Ce serait donc un moyen de contrôle de certains paramètres structuraux, notamment du facteur d'orientation des dipôles (κ^2) et de la distance interchromophorique (r) qui influent directement sur l'efficacité du transfert d'énergie selon la théorie de Förster ainsi que sur l'équilibre entre le mécanisme de transfert d'énergie de type Dexter et de type Förster.

L'introduction de cette thèse a mis en lumière les nombreuses contraintes rencontrées lors du développement de sondes optiques pour des applications biomédicales, et plus précisément d'agents d'imagerie bimodaux optique/nucléaire. Le fil conducteur des travaux réalisés repose sur la modification de la structure du BODIPY permettant de remplir certaines conditions du cahier des charges. Pour cela, nous avons développé des outils de synthèse dans le but de moduler les propriétés du fluorophore (solubilité, domaine d'absorption/émission), et de permettre sa bioconjugaison ainsi que son radiomarquage. Les études photophysiques réalisées sur une large gamme de composés apportent des données importantes sur l'influence des modifications structurales ainsi que des interactions interchromophoriques sur la fluorescence du BODIPY. Ces informations permettent de mieux maîtriser le comportement photophysique du fluorophore dans des milieux complexes tels que les tissus biologiques, et s'inscrivent également dans le processus de développement de sondes optiques pour des applications biomédicales.

EXPERIMENTAL SECTION

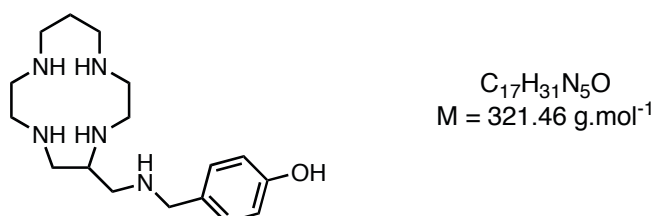
Instrumentation. The ^1H , ^{11}B and ^{13}C NMR spectra were recorded at room temperature on a Bruker Avance II 300 (300 MHz) at the “Welience, Pôle Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (WPCM)”. Chemical shifts (^1H NMR spectra) are expressed in ppm relative to chloroform (7.26 ppm). The UV-visible spectra were recorded on a Varian Cary 1 spectrophotometer. The mass spectra and accurate mass measurements (HR-MS) were obtained on a Bruker Daltonics Ultraflex II spectrometer in the MALDI/TOF reflectron mode using dithranol as a matrix or on a LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) instrument in ESI mode. Both measurements were registered at the “Welience, Pôle Chimie Moléculaire de l'Université de Bourgogne (WPCM)”. The steady-state fluorescence emission and excitation spectra were obtained on a Fluorolog SPEX 1680 0.22 m double monochromator spectrometer using quartz cuvettes (1 cm, 3 mL). All fluorescence spectra were corrected for apparatus response. The fluorescence lifetimes were measured in 2-MeTHF or DMSO/PBS 1:1 using a Timemaster Model TM-3/2003 apparatus from PTI incorporating a nitrogen laser as the source and a high-resolution dye laser (fwhm = 1.4 ns). Fluorescence lifetimes were obtained from high-quality decays and deconvolution or distribution lifetime analysis. The uncertainties were 100 ps on the basis of multiple measurements, which is also the limit of accuracy of this system.

Quantum Yield Measurements. Measurements were performed in distilled 2-MeTHF or in DMSO/PBS 1:1. Quartz cuvettes of 3 mL with path length of 1 cm equipped with a septum were used, and all solutions were Ar-degassed prior to measurements. Three different measurements (i.e., different solutions) were performed for each quantum yield. The sample concentrations were chosen to obtain an absorbance of about 0.05. The fluorescence quantum yield (Φ_F) measurements were performed with the slit width of 0.5-1.5 nm for both excitation and emission. Relative quantum efficiencies were obtained by comparing the areas under the corrected emission spectra of the sample relative to a known standard and the following equation was used to calculate Φ_F : $\Phi_F(\text{sample}) = \Phi_F(\text{standard}) \cdot (I(\text{sample})/I(\text{standard})) \cdot (A(\text{standard})/A(\text{sample})) \cdot (\eta(\text{sample})^2/\eta(\text{standard})^2)$ where $\Phi_F(\text{standard})$ is the reported quantum yield of the standard, I is the integrated emission spectrum, A is the absorbance at the excitation wavelength and η is the refractive index of the solvents used. Rhodamine 6G ($\Phi_F = 0.94$ in methanol),²¹⁵ Cresyl Violet ($\Phi_F = 0.54$ in methanol),¹⁷⁵ and Rhodamine 101 ($\Phi_F = 1.00$ in methanol)²¹⁶ were used as standards.²¹⁷ In all Φ_F determinations, correction for the solvent refractive index (η) was applied (2-MeTHF: $\eta = 1.406$, methanol: $\eta = 1.328$).²¹⁸

BODIPY-peptides (B5) purification and analysis. The crude product was purified by semi-preparative RP-HPLC on a Dionex Ultimate 3000 system (Thermo Scientific)

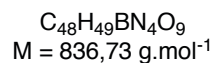
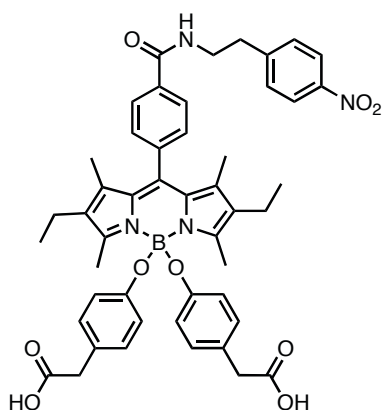
equipped with a Nucleodur C18ec column (Macherey-Nagel, 250 × 10 mm, 5 µm) with a gradient program (solvent A is water with 0.1% TFA and solvent B is acetonitrile with 0.1% TFA) at a flow rate of 2 mL/min with UV detection at 254, 530, 590 and 650 nm. Fractions were analysed by RP-HPLC on a Dionex Ultimate 3000 system, with a photodiode array detector, on a Chromolith HighResolution C18ec column (Merck, 50 × 4.6 mm), equipped with a guard column (5 × 4.6 mm), at a flow rate of 3 mL/min and the pure fractions were collected and lyophilized to yield the final compound (**B5**) as a highly purified (>95%) blue solid. The purity of the compound was determined by RP-HPLC at 254 nm. The identity of the compound was checked by low-resolution electrospray mass spectrometry (ESI-MS; Bruker) or by high-resolution electrospray mass spectrometry (HRMS; Orbitrap, Thermo Scientific).

Compound A1.

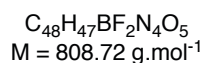
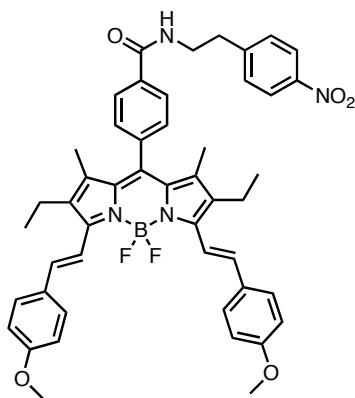


4-hydroxybenzaldehyde (0.57 g, 4.7 mmol) was added to a solution of (1,4,7,10-tetraazacyclotridecan-5-yl)methanamine (1.00 g, 4.7 mmol) in 110 mL of ethanol. The mixture was stirred at room temperature during one day and sodium borohydride (0.90 g, 23.8 mmol) was added. The mixture was stirred one more day and solvent was removed under vacuum. The residue was dissolved in 200 mL of chloroform, filtrated on clarcel® and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in 100 mL of ethanol and 20 mL of concentrated HCl was added. After stirring during 30 min, the mixture was filtrated and washed with 20 mL of diethyl ether. The white powder obtained was dissolved in 30 mL of NaOH 11 M and 50 mL of chloroform was added. The mixture was washed with water (3*30 mL). The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated to give **A1** as a white oil (m = 430 mg, yield = 29 %). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) δ 1.61 (m, 2H), 2.4-2.85 (m, 22H), 3.58 (s, 2H), 6.59 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H), 6.99 (d, ³J = 8.4 Hz, 2H).¹ ¹³C{¹H} NMR (CDCl₃, 75 MHz, 298 K): δ 28.7 (CH₂-β), 46.0, 47.5, 48.5, 49.1, 50.0, 50.1, 50.7, 51.6, 53.8, 56.9, 115.8 (*2), 129.5 (*2), 130.2, 157.2. ESI-MS : m/z = 322.28 [M+H]⁺.

¹ Signals of OH group were not observed in ¹H NMR of compound **A1**

Compound A2.

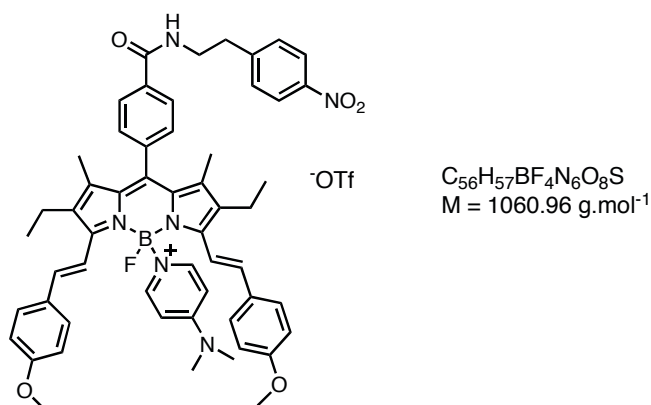
1 mL of a 0.2M solution of KOH (200 μmol) was slowly added to a solution of **9** (18 mg, 21 μmol) in 6 mL of methanol and the mixture was stirred at 35 °C. After 3 h, a solution of HCl 0.2M was slowly added at room temperature until pH = 5. The solvent was removed under vacuum and the residue was dissolved in 20 mL of dichloromethane. The solution was washed with water (3 x 20 mL), dried over MgSO_4 and solvent was removed. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (ethanol) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give **A2** as a red solid (m = 106 mg, yield = 76 %). ESI-MS: $m/z = 417.18$ $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$; 835.37 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 857.35 $[\text{M}-2\text{H}+\text{Na}]^-$.

Compound B1.

Compound **2** (500 mg, 0.87 mmol) and *p*-anisaldehyde (425 μL , 3.49 mmol) were dissolved in a mixture of dry toluene (50 mL), *p*-toluenesulfonic acid (APTS, 24 mg, 0.14 mmol) and piperidine (3 mL, 30 mmol). The mixture was refluxed during 2 h in a Dean-Stark apparatus and the solvent was removed *in situ*. 50 mL of dry toluene and 3 mL of piperidine were added and the mixture was refluxed 2 more hours. After total consumption of starting material followed by UV-Vis, the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3*100mL) and extracted with 100 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent

was evaporated to give a blue solid. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (DCM) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give **B1** as a blue solid (m = 521 mg, yield = 74 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ 1.08 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.22 (s, 6H), 2.53 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.05 (t, $^3J_A = 7.1$ Hz, 2H), 3.72 (td, $^3J_A = 7.1$ Hz, $^3J_B = 5.9$ Hz, 2H), 3.78 (s, 6H), 6.26 (t, $^3J_B = 5.9$ Hz, 1H), 6.87 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 4H), 7.15 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 2H), 7.35 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 7.37 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H), 7.51 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 4H), 7.60 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 2H), 7.79 (d, $^3J = 8.2$ Hz, 2H), 8.14 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ 11.8 (*2), 14.1 (*2), 18.4 (*2), 35.7, 41.0; 55.4 (*2) (O-CH₃), 114.3 (*4), 118.0 (*2), 123.9 (*2), 127.6 (*2), 128.8 (*4), 129.3 (*2), 129.6 (*2), 130.2 (*2), 132.5, 134.0 (*2), 134.6 (*2), 135.9 (*2), 136.2, 138.3 (*2), 139.8, 146.6, 146.9, 150.9 (*2), 160.4 (*2), 166.7 (C=O). ^{11}B NMR (CDCl_3 , 192.5 MHz, 298 K) δ 1.24 (t, $^1J = 34.4$ Hz). ESI-MS: $m/z = 831.3$ [$\text{M} + \text{Na}$]⁺; 847.3 [$\text{M} + \text{K}$]⁺. HRMS (ESI) 831.34749, calculated for $\text{C}_{48}\text{H}_{47}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_5\text{Na}$ 831.35079. UV-Vis (THF) λ nm (ϵ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$): 655 (96690), 606 (37695), 425 (11954), 369 (68717), 333 (30232), 317 (28053), 258 (24862).

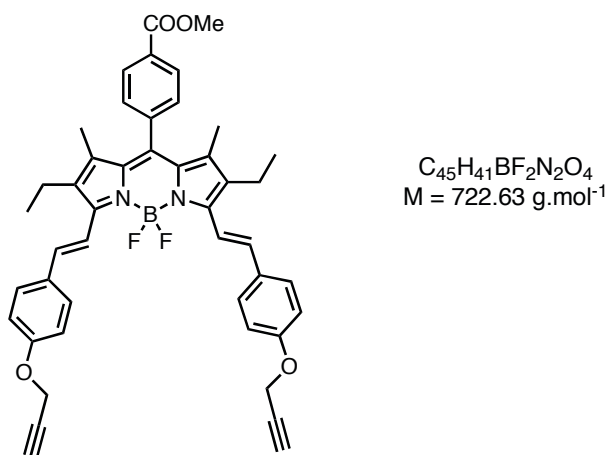
Compound B2.



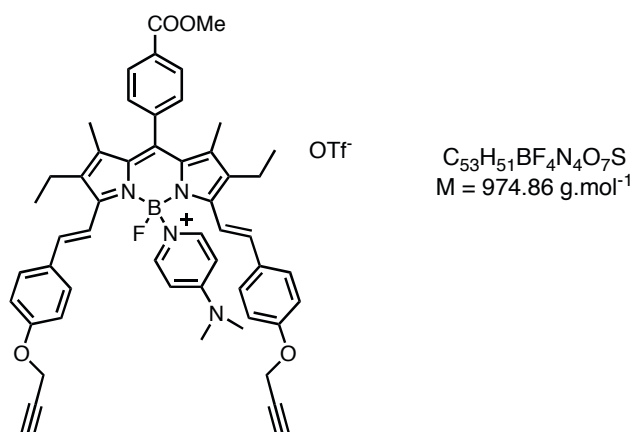
Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf, 134 μL , 0.742 mmol) and 91 mg of dimethylaminopyridine (DMAP, 0.742 mmol) were added to a solution of **B1** (300 mg, 0.371 mmol) in dry toluene (12 mL), and the mixture was stirred for 30 min at 80°C. The solvent was evaporated, the residue was washed with water (3*20 mL) and dried over magnesium sulfate. The solution was concentrated to dryness and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 97:3) to give **B2** as a red solid (m = 342 mg, yield = 87 %). ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ 1.06 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.37 (s, 6H), 2.47 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.02 (s, 6H), 3.16 (t, $^3J_A = 7.4$ Hz, 2H), 3.78 (td, $^3J_A = 7.4$ Hz, $^3J_B = 5.6$ Hz, 2H), 3.85 (s, 6H), 6.60 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 6.83 (d, $^3J = 16.6$ Hz, 2H), 6.94 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 4H), 7.08 (d, $^3J = 16.6$ Hz, 2H), 7.38 (d, $^3J = 8.7$ Hz, 4H), 7.44 (dd, $^3J_C = 7.7$ Hz, $^3J_D = 1.9$ Hz, 1H), 7.49 (t, $^3J = 8.6$ Hz, 2H), 7.56 (t, $^3J_B = 5.6$ Hz, 1H), 7.65 (dd, $^3J_C = 7.7$ Hz, $^3J_D = 1.9$ Hz, 1H), 7.86 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 8.11 (dd, $^3J_C = 7.7$ Hz, $^3J_D = 1.9$ Hz, 1H), 8.15 (d, $^3J = 8.6$ Hz, 2H), 8.13 (dd, $^3J_C = 7.7$ Hz, $^3J_D = 1.9$ Hz, 1H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ 12.1, 14.0, 18.1, 35.6, 39.9, 55.5, 107.2, 114.7, 115.2, 115.3, 123.7,

128.5, 128.6, 128.7, 128.8, 128.9, 129.9, 132.7, 135.1, 135.4, 137.4, 137.7, 138.7, 141.2, 141.3, 142.0, 146.6, 147.6, 151.5, 156.4, 161.0, 166.7. ^{11}B NMR (CDCl_3 , 192.5 MHz, 298 K) δ 1.53 (d, $^1J = 34.6$ Hz). ESI-MS : $m/z = 789.4$ $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2-\text{OTf}]^+$; 911.4 $[\text{M}-\text{OTf}]^+$. HRMS (ESI) 911.44342, calculated for $\text{C}_{55}\text{H}_{57}\text{BF}_1\text{N}_6\text{O}_5$ 911.44712. UV-Vis (THF) λ nm ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 658 (61), 443 (13), 376 (40), 286 (42).

Compound B3.

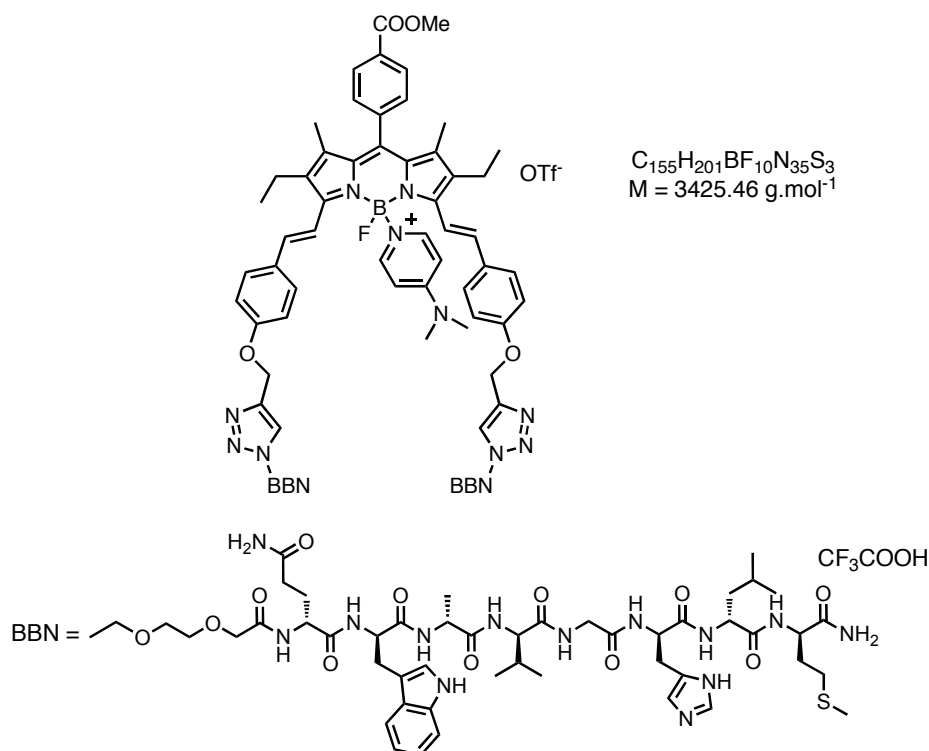


BODIPY ester (200 mg, 0.460 mmol) and 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (73.0 mg, 0.460 mmol) were dissolved in a mixture of dry toluene (20 mL), *p*-toluenesulfonic acid (PTSA, 50.0 mg, 0.290 mmol) and piperidine (989 μL , 10.0 mmol). The mixture was refluxed during 2 h in a Dean-Stark apparatus. The solvent was removed *in situ*, 10 mL of dry toluene and 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (73.0 mg, 0.460 mmol) were added. The mixture was refluxed for another 1 h and the solvent was removed. This step was repeated 5 times. After total consumption of starting material (monitored by UV-visible), the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3 x 50 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated to give a blue solid. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/heptane 50:50) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give **B3** (133 mg, 0.184 mmol) in 40 % yield as a blue solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K) δ (ppm): 1.13 (t, $J = 7.6$ Hz, 6H), 1.28 (s, 6H), 2.53 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.58 (q, $J = 7.6$ Hz, 4H), 3.97 (s, 3H), 4.73 (d, $J = 2.4$ Hz, 4H), 7.01 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.20 (d, $J = 16.6$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 4H), 7.66 (d, $J = 16.6$ Hz, 2H), 8.20 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K) δ 10.7, 13.0, 17.4, 51.4, 54.9, 74.7, 77.3, 114.2, 117.5, 127.8, 128.1, 129.3, 129.6, 130.1, 131.5, 133.0, 134.6, 137.4, 140.8, 149.8, 151.2, 157.1, 165.6. ^{11}B NMR (CDCl_3 , 192.5 MHz, 298 K) δ (ppm): 1.20 (t, $J = 34.6$ Hz). UV-visible (2-MeTHF): λ_{max} (nm) ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) = 255 (21), 332 (31), 366 (63), 428 (11), 604 (36), 654 (85). MS (ESI): $m/z = 745.30$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$. HRMS (ESI) 745.30308 calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{41}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_4\text{Na}$ 745.30273.

Compound B4.

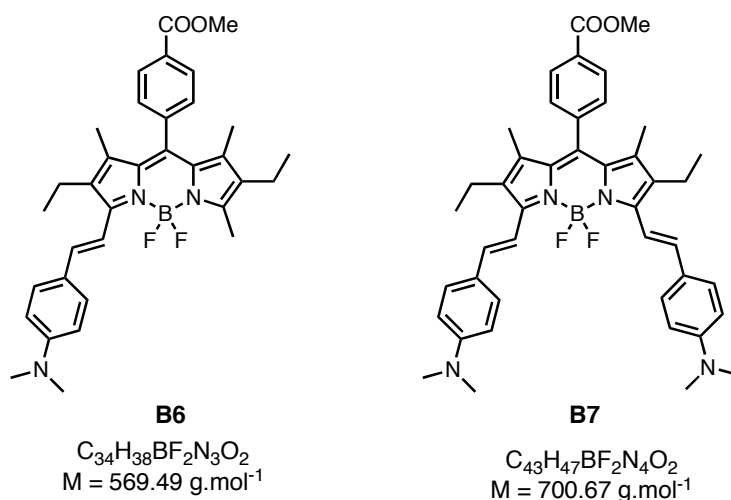
Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf, 3.0 μ L, 8.3 μ mol) and dimethylaminopyridine (2.0 mg, 16.6 μ mol) were added to a solution of **B3** (6.00 mg, 8 μ mol) in dry toluene (1 mL), and the mixture was stirred for 1 h at 80°C. The solvent was evaporated, the residue was washed with water (3*2 mL) and dried over magnesium sulfate. The solution was concentrated to dryness and the residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 96:4) to give **B4** as a purple solid (m = 1.50 mg, yield = 19 %). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz, 298 K): δ 1.07 (t, ³J = 7.5 Hz, 6H), 1.38 (s, 6H), 2.46 (q, ³J = 7.5 Hz, 2H), 2.47 (q, ³J = 7.5 Hz, 2H), 2.54 (t, ⁴J = 2.4 Hz, 2H), 3.06 (s, 6H), 3.99 (s, 3H), 4.74 (d, ⁴J = 2.5 Hz, 4H), 6.82 (d, ³J = 16.8 Hz, 2H), 6.85 (d, ³J = 7.1 Hz, 2H), 6.98 (d, ³J = 16.7 Hz, 2H), 7.00 (d, ³J = 8.8 Hz, 4H), 7.36 (d, ³J = 8.8 Hz, 4H), 7.43 (dd, ³J_C = 7.9 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H), 7.80 (dd, ³J_C = 7.9 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H), 7.88 (d, ³J = 7.1 Hz, 2H), 8.22 (dd, ³J_C = 7.9 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H), 8.29 (dd, ³J_C = 7.9 Hz, ⁴J_D = 1.7 Hz, 1H). ¹¹B NMR (CDCl₃, 192.5 MHz, 298 K): δ 1.18 (d, ¹J = 37.5 Hz). ESI-MS: m/z = 703.33 [M-C₇H₁₀N₂-OTf]⁺, 825.42 [M-OTf]⁺. HRMS (ESI) 825.39847 calcd for C₅₂H₅₁BFN₄O₄ 825.39906.

Compound B5.



11.3 μL of a 100 mM solution of BBN, TFA (DMF, 1.14 μmol), 22.6 μL of a 100 mM solution of compound **B4** (DMF, 2.28 μmol), 12.5 μL of a 200 mM solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (DMF, 2.51 μmol) and sodium ascorbate (0.90 mg, 4.54 μmol) were mixed together. The mixture was stirred at room temperature for 30 min and the reaction was monitored by HPLC. The crude product was purified by HPLC from 50 % to 80 % of B over 30 min to give **B5** as a red solid (conversion (HPLC) = 76 %, purity = 98.1 %, $t_R = 3.47$ min). ESI-MS: $m/z = 1016.65$ $[\text{M}+2\text{H}-\text{OTf}-2\text{TFA}]^{3+}$, 1023.71 $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}-\text{OTf}-2\text{TFA}]^{3+}$, 1031.10 $[\text{M}+2\text{Na}-\text{OTf}-2\text{TFA}]^{3+}$, 1474.08 $[\text{M}+\text{H}+\text{Na}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2-\text{OTf}-2\text{TFA}]^{2+}$, 1523.50 $[\text{M}+\text{H}-\text{OTf}-2\text{TFA}]^{2+}$, 1534.57 $[\text{M}+\text{Na}-\text{OTf}-2\text{TFA}]^{2+}$. HRMS (ESI) 1523.74618, calculated for $\text{C}_{150}\text{H}_{200}\text{BFN}_{36}\text{O}_{28}\text{S}_2$ 1523.74303.

Compounds B6 and B7.



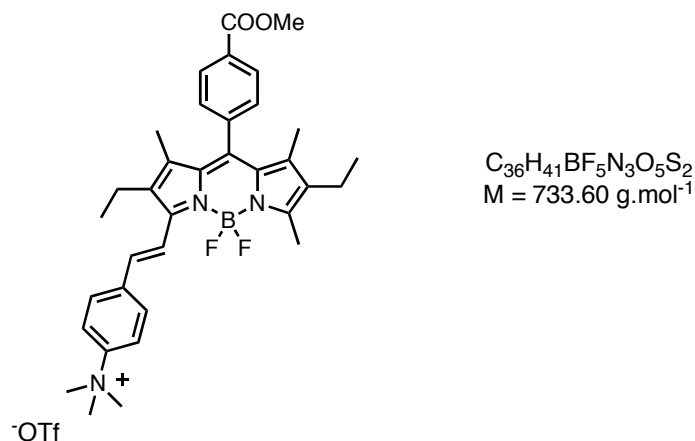
BODIPY ester (compound **18** of article II) (1.00 g, 2.28 mmol) and 4-(dimethylamino)benzaldehyde (386 mg, 2.51 mmol) were dissolved in a mixture of dry toluene (150 mL), 3 mL of acetic acid and 3 mL of piperidine. The mixture was refluxed during 2 h in a Dean-Stark apparatus and the solvent was removed *in situ*. After consumption of approximately a third of starting material (monitored by UV-visible), the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3 x 100 mL) and extracted with 100 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (dichloromethane/heptane 30:70 for **B6** and 50:50 for **B7**) followed by a recrystallization in a mixture of dichloromethane and hexane to give **B6** (m = 247 mg, yield = 19 %) and **B7** (m = 359 mg, yield = 22 %).

Characterization of B6. 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K) δ 0.97 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 3H), 1.13 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 2.29 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 2.56 (s, 3H), 2.59 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 3.00 (s, 6H), 3.96 (s, 3H), 6.69 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H), 7.20 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 1H), 7.41 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.49 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 2H), 7.56 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 1H), 8.15 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H). $^{13}C\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K) δ 11.6, 11.8, 14.0, 14.6, 17.1, 18.4, 40.3, 52.3, 112.2, 115.5, 127.7, 128.8, 129.0, 130.2, 130.5, 130.9, 131.6, 133.1, 133.4, 136.6, 136.7, 137.1, 138.5, 141.2, 150.9, 151.5, 153.6, 166.6. ^{11}B NMR ($CDCl_3$, 192.5 MHz, 298 K) δ 1.33 (t, $^1J = 33.9$ Hz). ESI-MS: $m/z = 592.44$ $[M+Na]^+$. HRMS (ESI) 560.30744, calculated for $C_{34}H_{39}BF_2N_3O_2$ 570.31039. UV-Vis (THF) λ nm ($\epsilon \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): 618 (71.1), 529 (8.6), 442 (9.8), 375 (17.6), 321 (21.0), 278 (11.3), 235 (22.6).

Characterization of B7. 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K) δ 1.14 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.30 (s, 6H), 2.59 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.01 (s, 12H), 3.97 (s, 3H), 6.72 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 4H), 7.20 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 2H), 7.43 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H), 7.53 (d, $^3J = 8.8$ Hz, 4H), 7.63 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 2H), 8.15 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 2H). $^{13}C\{^1H\}$ NMR ($CDCl_3$, 75 MHz, 298 K) δ 11.6, 14.0, 18.5, 40.4, 52.4, 112.3, 115.9, 126.0, 128.9, 129.5, 130.2, 130.5, 132.3, 133.6, 134.6, 136.3, 137.6, 141.6, 150.9, 166.7. ^{11}B NMR ($CDCl_3$, 192.5 MHz, 298 K) δ 1.33 (t, $^1J = 34.3$ Hz). ESI-MS: $m/z = 723.4$ $[M+Na]^+$. HRMS (ESI) 700.37393, calculated for

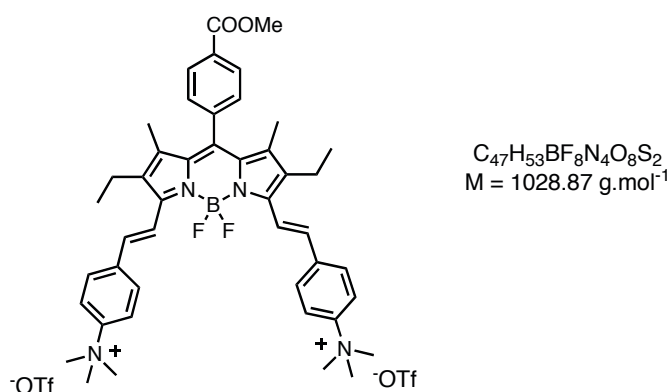
$C_{43}H_{47}BF_2N_4O_2$ 700.37620. UV-Vis (THF) λ nm ($\epsilon \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$): 711 (79.1), 651 (37.3), 502 (22.1), 420 (40.6), 336 (46.7), 286 (15.0), 231 (31.8).

Compound B8.



Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (5 μ L, 26 μ mol) was added to a solution of **B6** (15 mg, 36 μ mol) in 1 mL of dichloromethane and the solvent was evaporated. The resulting solid was washed with water (3*2 mL) and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over magnesium sulfate and the solvent was evaporated. The residue was washed three times with hexane and **B8** was obtained as a purple solid (m = 33 mg, yield = 89 %). 1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz, 298 K) δ 0.98 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 3H), 1.11 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 2.30 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 2.55 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 2.56 (s, 3H), 3.72 (s, 9H), 3.97 (s, 3H), 7.11 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 1H), 7.40 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H), 7.71 (d, $^3J = 16.7$ Hz, 1H), 7.72 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 2H), 7.75 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 2H), 8.17 (d, $^3J = 7.7$ Hz, 2H). ^{11}B NMR ($CDCl_3$, 192.5 MHz, 298 K) δ 1.14 (t, $^1J = 33.5$ Hz). HRMS (ESI) 584.32421, calculated for $C_{35}H_{41}BF_2N_3O_2^+$ 584.32605.

Compound B9.



Trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (11 μ L, 100 μ mol) was added to a solution of **B7** (25 mg, 36 μ mol) in 2 mL of dichloromethane. The mixture was stirred at room

temperature during 1 h. The mixture was filtrated and washed with hexane to give **B9** as a green solid (m = 33 mg, yield = 89 %). ^1H NMR (MeOD, 300 MHz, 298 K) δ 1.17 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 6H), 1.41 (s, 6H), 2.69 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 4H), 3.72 (s, 18H), 3.99 (s, 3H), 7.39 (d, $^3J = 16.8$ Hz, 2H), 7.57 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2H), 7.83 (d, $^3J = 16.8$ Hz, 2H), 7.88 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 4H), 7.98 (d, $^3J = 9.1$ Hz, 2H), 8.25 (d, $^3J = 8.4$ Hz, 2H). ^{11}B NMR (MeOD, 192.5 MHz, 298 K) δ 1.14 (t, $^1J = 34.2$ Hz). ESI-MS: $m/z = 350.2$ $[\text{M}-2\text{CH}_3]^2+$, 357.7 $[\text{M}-\text{CH}_3]^2+$, 365.2 $[\text{M}]^2+$, 715.39984 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$. HRMS (ESI) 365.21116, calculated for $\text{C}_{45}\text{H}_{53}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_2^{2+}$ 365.21132.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) Weissleder, R.; Pittet, M. J. *Nature* **2008**, *452*, 580.
- (2) Pysz, M. A.; Gambhir, S. S.; Willmann, J. K. *Clin. Radiol.* **2010**, *65*, 500.
- (3) Smith, S. M.; Jenkinson, M.; Woolrich, M. W.; Beckmann, C. F.; Behrens, T. E. J.; Johansen-Berg, H.; Bannister, P. R.; De Luca, M.; Drobnjak, I.; Flitney, D. E.; Niazy, R. K.; Saunders, J.; Vickers, J.; Zhang, Y.; De Stefano, N.; Brady, J. M.; Matthews, P. M. *Neuroimage* **2004**, *23 Suppl 1*, S208.
- (4) Weissleder, R.; Ntziachristos, V. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 123.
- (5) Condeelis, J.; Weissleder, R. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a003848.
- (6) James, M. L.; Gambhir, S. S. *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 897.
- (7) Nolting, D. D.; Gore, J. C.; Pham, W. *Curr. Org. Synth.* **2011**, *8*, 521.
- (8) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620.
- (9) Van Veen, R. L. P.; Sterenborg, H. J. C. M.; Pifferi, A.; Torricelli, A.; Chikoidze, E.; Cubeddu, R. *J. Biomed. Opt.* **2005**, *10*, 054004/1.
- (10) Sato, N.; Hagihara, B.; Kamada, T.; Abe, H. *Anal. Biochem.* **1976**, *74*, 105.
- (11) Anderson, R. R.; Parrish, J. A. *J. Invest. Dermatol.* **1981**, *77*, 13.
- (12) Wagnieres, G. A.; Star, W. M.; Wilson, B. C. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 603.
- (13) Frangioni, J. V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 626.
- (14) Elson, D. S.; Galletly, N.; Talbot, C.; Requejo-Isidro, J.; McGinty, J.; Dunsby, C.; Lanigan, P. M. P.; Munro, I.; Benninger, R. K. P.; De Beule, P.; Auksoorius, E.; Hegyi, L.; Sandison, A.; Wallace, A.; Soutter, P.; Neil, M. A. A.; Lever, J.; Stamp, G. W.; French, P. M. W. *Rev. Fluoresc.* **2006**, *3*, 477.
- (15) McGinty, J.; Galletly, N. P.; Dunsby, C.; Munro, I.; Elson, D. S.; Requejo-Isidro, J.; Cohen, P.; Ahmad, R.; Forsyth, A.; Thillainayagam, A. V.; Neil, M. A. A.; French, P. M. W.; Stamp, G. W. *Biom. Opt. Express* **2010**, *1*, 627.
- (16) Huttenberger, D.; Gabrecht, T.; Wagnieres, G.; Weber, B.; Linder, A.; Foth, H. J.; Freitag, L. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2008**, *5*, 139.
- (17) Pavlova, I.; Weber, C. R.; Schwarz, R. A.; Williams, M.; El-Naggar, A.; Gillenwater, A.; Richards-Kortum, R. *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13*, 064012.
- (18) Sun, Y.; Hatami, N.; Yee, M.; Phipps, J.; Elson, D. S.; Gorin, F.; Schrot, R. J.; Marcu, L. *J. Biomed. Opt.* **2010**, *15*, 056022/1.
- (19) Yang, X. J.; Mei, J. *Tong Ji Yi Ke Da Xue Xue Bao* **2010**, *31*, 107.
- (20) Péry, E., Thèse de l'Université de Nancy, **2007**.

-
- (21) Weissleder, R.; Tung, C.-H.; Mahmood, U.; Bogdanov, A., Jr. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 375.
- (22) Gioux, S.; Choi, H. S.; Frangioni, J. V. *Mol. Imaging* **2010**, *9*, 237.
- (23) Van Dam, G. M.; Themelis, G.; Crane, L. M. A.; Harlaar, N. J.; Pleijhuis, R. G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; de Jong, J. S.; Arts, H. J. G.; van der Zee, A. G. J.; Bart, J.; Low, P. S.; Ntziachristos, V. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1315.
- (24) Liu, Y.; Zhao, Y.-M.; Akers, W.; Tang, Z.-Y.; Fan, J.; Sun, H.-C.; Ye, Q.-H.; Wang, L.; Achilefu, S. *Transl. Res.* **2013**, *162*, 324.
- (25) Rizo, P.; Dinten, J. M.; Texier, I. In *BioTribune*; Springer: 2009; Vol. 33.
- (26) Jain, R. K.; Munn, L. L.; Fukumura, D. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 266.
- (27) Van der Poel, H. G.; Buckle, T.; Brouwer, O. R.; Valdes, O. R. A.; van Leeuwen, F. W. B. *Eur. Urol.* **2011**, *60*, 826.
- (28) Astner, S.; Dietterle, S.; Otberg, N.; Rowert-Huber, H.-J.; Stockfleth, E.; Lademann, J. *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13*, 014003.
- (29) Ntziachristos, V. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8*, 1.
- (30) Berezin, M. Y.; Achilefu, S. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2641.
- (31) Schmidt, F. E. W., Thèse de l'Université de Londres, **1999**.
- (32) Ntziachristos, V.; Tung, C.-H.; Bremer, C.; Weissleder, R. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 757.
- (33) Ghosh, S. C.; Ghosh, P.; Wilganowski, N.; Robinson, H.; Hall, M. A.; Dickinson, G.; Pinkston, K. L.; Harvey, B. R.; Sevic-Muraca, E. M.; Azhdarinia, A. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 406.
- (34) Lavis, L. D.; Raines, R. T. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142.
- (35) Choi, H. S.; Liu, W.; Misra, P.; Tanaka, E.; Zimmer, J. P.; Ipe, B. I.; Bawendi, M. G.; Frangioni, J. V. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1165.
- (36) Zhang, S.; Wu, T.; Fan, J.; Li, Z.; Jiang, N.; Wang, J.; Dou, B.; Sun, S.; Song, F.; Peng, X. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 555.
- (37) Louie, A. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3146.
- (38) Ptaszek, M. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2013**, *113*, 59.
- (39) Alivisatos, A. P. *Science* **1996**, *271*, 933.
- (40) Chan, W. C. W.; Maxwell, D. J.; Gao, X.; Bailey, R. E.; Han, M.; Nie, S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 40.
- (41) Woods, M.; Woessner, D. E.; Sherry, A. D. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 500.
- (42) Que, E. L.; Domaille, D. W.; Chang, C. J. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1517.
- (43) Konig, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1925**, *38*, 743.
- (44) Mujumdar, S. R.; Mujumdar, R. B.; Grant, C. M.; Waggoner, A. S. *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 356.
- (45) MICAD 2013.
- (46) Philip, R.; Penzkofer, A.; Baeumler, W.; Szeimies, R. M.; Abels, C. *J. Photochem. Photobiol., A* **1996**, *96*, 137.

- (47) Haugland, R. P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals.*; 9th ed.; Molecular probes: **2002**.
- (48) Reynolds, G. A.; Drexhage, K. H. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 885.
- (49) Beverina, L.; Salice, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1207.
- (50) Ros-Lis, J. V.; Garcia, B.; Jimenez, D.; Martinez-Manez, R.; Sancenon, F.; Soto, J.; Gonzalvo, F.; Valldecabres, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4064.
- (51) Gassensmith, J. J.; Baumes, J. M.; Smith, B. D. *Chem. Commun.* **2009**, 6329.
- (52) Cole, E. L.; Arunkumar, E.; Xiao, S.; Smith, B. A.; Smith, B. D. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5769.
- (53) Lavis, L. D.; Rutkoski, T. J.; Raines, R. T. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6775.
- (54) Lee, L. G.; Berry, G. M.; Chen, C. H. *Cytometry* **1989**, *10*, 151.
- (55) Egawa, T.; Koide, Y.; Hanaoka, K.; Komatsu, T.; Terai, T.; Nagano, T. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4162.
- (56) Beija, M.; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2410.
- (57) Romieu, A.; Tavernier-Lohr, D.; Pellet-Rostaing, S.; Lemaire, M.; Renard, P.-Y. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3304.
- (58) Liu, J.; Diwu, Z.; Leung, W.-Y.; Lu, Y.; Patch, B.; Haugland, R. P. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4355.
- (59) Sun, Y.-Q.; Liu, J.; Lv, X.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Guo, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 7634.
- (60) Kolmakov, K.; Wurm, C. A.; Meineke, D. N. H.; Goettfert, F.; Boyarskiy, V. P.; Belov, V. N.; Hell, S. W. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 146.
- (61) Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R.; Editors *The Porphyrin Handbook: Volume 14*; Academic Press: **2003**.
- (62) Cao, W.; Ng, K. K.; Corbin, I.; Zhang, Z.; Ding, L.; Chen, J.; Zheng, G. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2023.
- (63) Liu, T. W.; Akens, M. K.; Chen, J.; Wise-Milestone, L.; Wilson, B. C.; Zheng, G. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1021.
- (64) Kee, H. L.; Kirmaier, C.; Tang, Q.; Diers, J. R.; Muthiah, C.; Taniguchi, M.; Laha, J. K.; Ptaszek, M.; Lindsey, J. S.; Bocian, D. F.; Holten, D. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 1110.
- (65) Kee, H. L.; Kirmaier, C.; Tang, Q.; Diers, J. R.; Muthiah, C.; Taniguchi, M.; Laha, J. K.; Ptaszek, M.; Lindsey, J. S.; Bocian, D. F.; Holten, D. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 1125.
- (66) Laha, J. K.; Muthiah, C.; Taniguchi, M.; McDowell, B. E.; Ptaszek, M.; Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5122.
- (67) Kim, H.-J.; Lindsey, J. S. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5475.
- (68) Jiang, J.; Vairaprakash, P.; Reddy, K. R.; Sahin, T.; Pavan, M. P.; Lubian, E.; Lindsey, J. S. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 86.

- (69) Grin, M. A.; Mironov, A. F.; Shtil, A. A. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 683.
- (70) Peng, X.; Draney, D. R.; Volcheck, W. M.; Bashford, G. R.; Lamb, D. T.; Grone, D. L.; Zhang, Y.; Johnson, C. M. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **2006**, 6097, 60970E/1.
- (71) Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3897.
- (72) Ethirajan, M.; Chen, Y.; Joshi, P.; Pandey, R. K. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 340.
- (73) Tatman, D.; Liddell, P. A.; Moore, T. A.; Gust, D.; Moore, A. L. *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 459.
- (74) Loudet, A.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891.
- (75) Ulrich, G.; Zissel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184.
- (76) Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130.
- (77) Karolin, J.; Johansson, L. B. A.; Strandberg, L.; Ny, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7801.
- (78) Burghart, A.; Kim, H.; Welch, M. B.; Thoresen, L. H.; Reibenspies, J.; Burgess, K.; Bergstroem, F.; Johansson, L. B. A. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7813.
- (79) Yamada, K.; Toyota, T.; Takakura, K.; Ishimaru, M.; Sugawara, T. *New J. Chem.* **2001**, *25*, 667.
- (80) Sathyamoorthi, G.; Soong, M. L.; Ross, T. W.; Boyer, J. H. *Heteroat. Chem.* **1993**, *4*, 603.
- (81) Killoran, J.; Allen, L.; Gallagher, J. F.; Gallagher, W. M.; O'Shea, D. F. *Chem. Commun.* **2002**, 1862.
- (82) Wada, M.; Ito, S.; Uno, H.; Murashima, T.; Ono, N.; Urano, T.; Urano, Y. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6711.
- (83) Shen, Z.; Roehr, H.; Rurack, K.; Uno, H.; Spieles, M.; Schulz, B.; Reck, G.; Ono, N. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10*, 4853.
- (84) Goeb, S.; Zissel, R. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 737.
- (85) Fischer, G. M.; Ehlers, A. P.; Zumbusch, A.; Daltrozzo, E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 3750.
- (86) Zhou, M.; Zhang, X.; Bai, M.; Shen, D.; Xu, B.; Kao, J.; Ge, X.; Achilefu, S. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 6756.
- (87) Umezawa, K.; Matsui, A.; Nakamura, Y.; Citterio, D.; Suzuki, K. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 1096.
- (88) Ulrich, G.; Goeb, S.; De Nicola, A.; Retailleau, P.; Zissel, R. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4489.
- (89) Rurack, K.; Kollmannsberger, M.; Daub, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 385.
- (90) Bura, T.; Retailleau, P.; Ulrich, G.; Zissel, R. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1109.
- (91) Buyukcakil, O.; Bozdemir, O. A.; Kolemen, S.; Erbas, S.; Akkaya, E. U. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4644.
- (92) Li, L.; Han, J.; Nguyen, B.; Burgess, K. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1963.

-
- (93) Ni, Y.; Zeng, L.; Kang, N.-Y.; Huang, K.-W.; Wang, L.; Zeng, Z.; Chang, Y.-T.; Wu, J. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 2301.
- (94) Bartelmess, J.; Weare, W. W. *Dyes Pigm.* **2013**, *97*, 1.
- (95) Niu, S.-I.; Massif, C.; Ulrich, G.; Renard, P.-Y.; Romieu, A.; Ziessel, R. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 7229.
- (96) Romieu, A.; Massif, C.; Rihn, S.; Ulrich, G.; Ziessel, R.; Renard, P.-Y. *New J. Chem.* **2013**, *37*, 1016.
- (97) Poirel, A.; Retailleau, P.; De Nicola, A.; Ziessel, R. *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 1192.
- (98) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell* **2011**, *144*, 646.
- (99) Torchilin, V. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, *63*, 131.
- (100) Torchilin, V. *Handbook of Targeted Delivery of Imaging Agents*; Boca Raton FL: CRC: **1995**.
- (101) Joshi, B. P.; Wang, T. D. *Cancers* **2010**, *2*, 1251.
- (102) Lee, S.; Xie, J.; Chen, X. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3087.
- (103) Fani, M.; Maecke, H. R.; Okarvi, S. M. *Theranostics* **2012**, *2*, 481.
- (104) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*; elsevier: **1996**.
- (105) Gauthier, M. A.; Klok, H.-A. *Chem. Commun.* **2008**, 2591.
- (106) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- (107) Becer, C. R.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4900.
- (108) Dommerholt, J.; Schmidt, S.; Temming, R.; Hendriks, L. J. A.; Rutjes, F. P. J. T.; van Hest, J. C. M.; Lefebvre, D. J.; Friedl, P.; van Delft, F. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 9422.
- (109) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. *ACS Chem. Biol.* **2014**, Ahead of Print.
- (110) Carroll, L.; Evans, H. L.; Aboagye, E. O.; Spivey, A. C. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5772.
- (111) Beyer, T.; Townsend, D. W.; Brun, T.; Kinahan, P. E.; Charron, M.; Roddy, R.; Jerin, J.; Young, J.; Byars, L.; Nutt, R. *J. Nucl. Med.* **2000**, *41*, 1369.
- (112) Signore, A.; Mather, S. J.; Piaggio, G.; Malviya, G.; Dierckx, R. A. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3112.
- (113) Dias, C. R.; Jeger, S.; Osso, J. A.; Mueller, C.; De Pasquale, C.; Hohn, A.; Waibel, R.; Schibli, R. *Nucl. Med. Biol.* **2011**, *38*, 19.
- (114) Mewis, R. E.; Archibald, S. J. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 1686.
- (115) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2858.
- (116) Bakker, W. H.; Albert, R.; Bruns, C.; Breeman, W. A. P.; Hofland, L. J.; Marbach, P.; Pless, J.; Pralet, D.; Stolz, B.; Koper, J. W.; Lamberts, S. W. J.; Visser, T. J.; Krenning, E. P. *Life Sci.* **1991**, *49*, 1583.

- (117) Henze, M.; Schuhmacher, J.; Hipp, P.; Kowalski, J.; Becker, D. W.; Doll, J.; Macke, H. R.; Hofmann, M.; Debus, J.; Haberkorn, U. *J. Nucl. Med.* **2001**, *42*, 1053.
- (118) Otte, A.; Herrmann, R.; Heppeler, A.; Behe, M.; Jermann, E.; Powell, P.; Maecke, H. R.; Muller, J. *Eur. J. Nucl. Med.* **1999**, *26*, 1439.
- (119) Zhang, Y.; Hong, H.; Severin, G. W.; Engle, J. W.; Yang, Y.; Goel, S.; Nathanson, A. J.; Liu, G.; Nickles, R. J.; Leigh, B. R.; Barnhart, T. E.; Cai, W. *Am. J. Transl. Res.* **2012**, *4*, 333.
- (120) Ogawa, M.; Regino, C. A. S.; Seidel, J.; Green, M. V.; Xi, W.; Williams, M.; Kosaka, N.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2177.
- (121) Sampath, L.; Kwon, S.; Hall, M. A.; Price, R. E.; Sevick-Muraca, E. M. *Transl. Oncol.* **2010**, *3*, 307.
- (122) Hall, M. A.; Kwon, S.; Robinson, H.; Lachance, P.-A.; Azhdarinia, A.; Ranganathan, R.; Price, R. E.; Chan, W.; Sevick-Muraca, E. M. *Prostate* **2012**, *72*, 129.
- (123) Buckle, T.; Chin, P. T. K.; van Leeuwen, F. W. B. *Nanotechnology* **2010**, *21*, 482001/1.
- (124) Jennings, L. E.; Long, N. J. *Chem. Commun.* **2009**, 3511.
- (125) Hong, H.; Zhang, Y.; Severin, G. W.; Yang, Y.; Engle, J. W.; Niu, G.; Nickles, R. J.; Chen, X.; Leigh, B. R.; Barnhart, T. E.; Cai, W. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 2339.
- (126) Azhdarinia, A.; Ghosh, P.; Ghosh, S.; Wilganowski, N.; Sevick-Muraca, E. M. *Mol. Imaging Biol.* **2012**, *14*, 261.
- (127) Achilefu, S. *Technol. Cancer Res. Treat.* **2004**, *3*, 393.
- (128) Edwards, W. B.; Akers, W. J.; Ye, Y.; Cheney, P. P.; Bloch, S.; Xu, B.; Laforest, R.; Achilefu, S. *Mol. Imaging* **2009**, *8*, 101.
- (129) Banerjee, S. R.; Pullambhatla, M.; Byun, Y.; Nimmagadda, S.; Foss, C. A.; Green, G.; Fox, J. J.; Lupold, S. E.; Mease, R. C.; Pomper, M. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 9167.
- (130) Ting, R.; Aguilera, T. A.; Crisp, J. L.; Hall, D. J.; Eckelman, W. C.; Vera, D. R.; Tsien, R. Y. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1811.
- (131) Zhou, Y.; Kim, Y.-S.; Yan, X.; Jacobson, O.; Chen, X.; Liu, S. *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 1198.
- (132) Bernhard, C.; Goze, C.; Rousselin, Y.; Denat, F. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8267.
- (133) Lhenry, D., Thèse de l'Université de Bourgogne, **en cours**.
- (134) Ulrich, G.; Goze, C.; Guardigli, M.; Roda, A.; Ziessel, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 3694.
- (135) Goze, C.; Ulrich, G.; Ziessel, R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 313.
- (136) Ziessel, R.; Ulrich, G.; Harriman, A. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 496.
- (137) Lundrigan, T.; Thompson, A. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 757.
- (138) Kumaresan, D.; Thummel, R. P.; Bura, T.; Ulrich, G.; Ziessel, R. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15*, 6335.

- (139) Kim, H.; Burghart, A.; Welch, M. B.; Reibenspies, J.; Burgess, K. *Chem. Commun.* **1999**, 1889.
- (140) Loudet, A.; Bandichhor, R.; Burgess, K.; Palma, A.; McDonnell, S. O.; Hall, M. J.; O'Shea, D. F. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4771.
- (141) Tomimori, Y.; Okujima, T.; Yano, T.; Mori, S.; Ono, N.; Yamada, H.; Uno, H. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3187.
- (142) Gabe, Y.; Ueno, T.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386, 621.
- (143) Palma, A.; Tasior, M.; Frimannsson, D. O.; Vu, T. T.; Meallet-Renault, R.; O'Shea, D. F. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3638.
- (144) Tahtaoui, C.; Thomas, C.; Rohmer, F.; Klotz, P.; Duportail, G.; Mely, Y.; Bonnet, D.; Hibert, M. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 269.
- (145) Wijesinghe, C. A.; El-Khouly, M. E.; Subbaiyan, N. K.; Supur, M.; Zandler, M. E.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S.; D'Souza, F. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 3147.
- (146) Bernhard, C., Thèse de l'Université de Bourgogne, **2011**.
- (147) Rousselin, Y.; Sok, N.; Boschetti, F.; Guillard, R.; Denat, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1688.
- (148) Sok, N., Thèse de l'Université de Bourgogne, **2010**.
- (149) Pascu, S. I.; Waghorn, P. A.; Conry, T. D.; Betts, H. M.; Dilworth, J. R.; Churchill, G. C.; Pokrovskaya, T.; Christlieb, M.; Aigbirhio, F. I.; Warren, J. E. *Dalton Trans.* **2007**, 4988.
- (150) Kimura, R. H.; Miao, Z.; Cheng, Z.; Gambhir, S. S.; Cochran, J. R. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 436.
- (151) Edwards, W. B.; Xu, B.; Akers, W.; Cheney, P. P.; Liang, K.; Rogers, B. E.; Anderson, C. J.; Achilefu, S. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 192.
- (152) Ono, M.; Ishikawa, M.; Kimura, H.; Hayashi, S.; Matsumura, K.; Watanabe, H.; Shimizu, Y.; Cheng, Y.; Cui, M.; Kawashima, H.; Saji, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3885.
- (153) Ting, R.; Lo, J.; Adam, M. J.; Ruth, T. J.; Perrin, D. M. *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 349.
- (154) Lasne, M.-C.; Perrio, C.; Rouden, J.; Barre, L.; Roeda, D.; Dolle, F.; Crouzel, C. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *222*, 201.
- (155) Welch, M. J.; Redvanly, C. S.; Editors *Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications*; John Wiley & Sons Ltd.: **2003**.
- (156) Adam, M. J.; Wilbur, D. S. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 153.
- (157) Le Bars, D. *J. Fluorine Chem.* **2006**, *127*, 1488.
- (158) Luo, Y. R. *Handbook of Chemical Bond Energies* **2007**.
- (159) Hudnall, T. W.; Gabbai, F. P. *Chem. Commun.* **2008**, 4596.
- (160) Hudnall, T. W.; Lin, T.-P.; Gabbai, F. P. *J. Fluorine Chem.* **2010**, *131*, 1182.

- (161) Li, Z.; Lin, T.-P.; Liu, S.; Huang, C.-W.; Hudnall, T. W.; Gabbai, F. P.; Conti, P. S. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 9324.
- (162) Hendricks, J. A.; Keliher, E. J.; Wan, D.; Hilderbrand, S. A.; Weissleder, R.; Mazitschek, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, 51, 4603.
- (163) Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L. *N. Engl. J. Med.* **2001**, 344, 783.
- (164) Liu, S.; Lin, T.-P.; Li, D.; Leamer, L.; Shan, H.; Li, Z.; Gabbai, F. P.; Conti, P. S. *Theranostics* **2013**, 3, 181.
- (165) Yuan, H.; Cho, H.; Chen, H. H.; Panagia, M.; Sosnovik, D. E.; Josephson, L. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 10361.
- (166) Liu, S.; Li, D.; Shan, H.; Gabbai, F. P.; Li, Z.; Conti, P. S. *Nucl. Med. Biol.* **2014**, 41, 120.
- (167) Mula, S.; Ulrich, G.; Ziessel, R. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 6383.
- (168) Giannopoulos, T.; Ferguson, J. R.; Wakefield, B. J.; Varvounis, G. *Tetrahedron* **2000**, 56, 447.
- (169) Mladenova, G.; Annedi, S. C.; Ramnauth, J.; Maddaford, S. P.; Rakhit, S.; Andrews, J. S.; Zhang, D.; Porreca, F. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 3488.
- (170) Mammen, M.; Chio, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, 37, 2755.
- (171) Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, 45, 2348.
- (172) Ziessel, R.; Ulrich, G.; Harriman, A.; Alamiry, M. A. H.; Stewart, B.; Retailleau, P. *Chem. - Eur. J.* **2009**, 15, 1359.
- (173) Tasior, M.; Murtagh, J.; Frimannsson, D. O.; McDonnell, S. O.; O'Shea, D. F. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 522.
- (174) Niu, S. L.; Ulrich, G.; Ziessel, R.; Kiss, A.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. *Org. Lett.* **2009**, 11, 2049.
- (175) Magde, D.; Brannon, J. H.; Cremers, T. L.; Olmsted, J., III *J. Phys. Chem.* **1979**, 83, 696.
- (176) Keliher, E. J.; Klubnick, J. A.; Reiner, T.; Mazitschek, R.; Weissleder, R. *Chemmedchem* **2014**, ASAP.
- (177) Wan, C.-W.; Burghart, A.; Chen, J.; Bergstroem, F.; Johansson, L. B. A.; Wolford, M. F.; Kim, T. G.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R. M.; Burgess, K. *Chem. - Eur. J.* **2003**, 9, 4430.
- (178) Harriman, A.; Mallon, L. J.; Elliot, K. J.; Haefele, A.; Ulrich, G.; Ziessel, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13375.
- (179) Valeur, B. *Invitation à la fluorescence moléculaire*; 1st ed. **2004**.
- (180) Suppan, P. *Chemistry and light*; 1st ed. **1994**.
- (181) Gilbert, A.; Baggott, J. *Essential of Molecular Photochemistry*; 2nd ed. **1995**.
- (182) Forster, T. *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, 27, 7.
- (183) Dexter, D. L. *J. Chem. Phys.* **1953**, 21, 836.

- (184) Clegg, R. M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6, 103.
- (185) Angers, S.; Salahpour, A.; Joly, E.; Hilairet, S.; Chelsky, D.; Dennis, M.; Bouvier, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97, 3684.
- (186) Miyawaki, A. *Dev. Cell* **2003**, 4, 295.
- (187) Stefan, L.; Denat, F.; Monchaud, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 20405.
- (188) Bura, T.; Retailleau, P.; Ziessel, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, 49, 6659.
- (189) Eggenspieler, A.; Takai, A.; El-Khouly, M. E.; Ohkubo, K.; Gros, C. P.; Bernhard, C.; Goze, C.; Denat, F.; Barbe, J.-M.; Fukuzumi, S. *J. Phys. Chem. A* **2012**, 116, 3889.
- (190) D'Souza, F.; Smith, P. M.; Zandler, M. E.; McCarty, A. L.; Itou, M.; Araki, Y.; Ito, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 7898.
- (191) Gros, C. P.; Brisach, F.; Meristoudi, A.; Espinosa, E.; Guillard, R.; Harvey, P. D. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 125.
- (192) Johnson, A. W.; Kay, I. T. *J. Chem. Soc.* **1965**, 1620.
- (193) Gross, Z.; Galili, N.; Saltsman, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, 38, 1427.
- (194) Paolesse, R.; Nardis, S.; Sagone, F.; Khoury, R. G. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 550.
- (195) Stefanelli, M.; Pomarico, G.; Tortora, L.; Nardis, S.; Fronczek, F. R.; McCandless, G. T.; Smith, K. M.; Manowong, M.; Chen, P.; Kadish, K. M.; Rosa, A.; Ricciardi, G.; Paolesse, R. *Inorg. Chem.* **2012**, 51, 6928.
- (196) Czechowski, N.; Nowak-Krol, A.; Gryko, D. T.; Mackowski, S. *Phys. Scr.* **2013**, T157, 014009/1.
- (197) Gross, Z. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, 6, 733.
- (198) Gross, Z.; Golubkov, G.; Simkhovich, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 4045.
- (199) Simkhovich, L.; Mahammed, A.; Goldberg, I.; Gross, Z. *Chem. - Eur. J.* **2001**, 7, 1041.
- (200) Agadjanian, H.; Ma, J.; Rentsendorj, A.; Valluripalli, V.; Hwang, J. Y.; Mahammed, A.; Farkas, D. L.; Gray, H. B.; Gross, Z.; Medina-Kauwe, L. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 6105.
- (201) Lim, P.; Mahammed, A.; Okun, Z.; Saltsman, I.; Gross, Z.; Gray, H. B.; Termini, J. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, 25, 400.
- (202) Mahammed, A.; Gray, H. B.; Weaver, J. J.; Sorasaene, K.; Gross, Z. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 738.
- (203) Huang, J.; Liu, H. *Huanan Shifan Daxue Xuebao Ziran Kexueban* **2013**, 45, 8.
- (204) Walker, D.; Chappel, S.; Mahammed, A.; Brunschwig, B. S.; Winkler, J. R.; Gray, H. B.; Zaban, A.; Gross, Z. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2006**, 10, 1259.
- (205) Flamigni, L.; Gryko, D. T. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 1635.
- (206) Aviv, I.; Gross, Z. *Chem. Commun.* **2007**, 1987.
- (207) Bendix, J.; Dmochowski, I. J.; Gray, H. B.; Mahammed, A.; Simkhovich, L.; Gross, Z. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 4048.

-
- (208) Weaver, J. J.; Sorasaene, K.; Sheikh, M.; Goldschmidt, R.; Tkachenko, E.; Gross, Z.; Gray, H. B. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2004**, 8, 76.
- (209) Poulin, J.; Stern, C.; Guillard, R.; Harvey, P. D. *Photochem. Photobiol.* **2006**, 82, 171.
- (210) Giribabu, L.; Kandhadi, J.; Kanaparthi, R. K.; Reeta, P. S. *J. Lumin.* **2014**, 145, 357.
- (211) Ngo, T. H.; Nastasi, F.; Puntoriero, F.; Campagna, S.; Dehaen, W.; Maes, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2012, 5605.
- (212) Ciuciu, A. I.; Flamigni, L.; Voloshchuk, R.; Gryko, D. T. *Chem. - Asian J.* **2013**, 8, 1004.
- (213) Tasior, M.; Gryko, D. T.; Pielacinska, D. J.; Zanelli, A.; Flamigni, L. *Chem. - Asian J.* **2010**, 5, 130.
- (214) D'Souza, F.; Chitta, R.; Ohkubo, K.; Tasior, M.; Subbaiyan, N. K.; Zandler, M. E.; Rogacki, M. K.; Gryko, D. T.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14263.
- (215) Baeumler, W.; Penzkofer, A. *Chem. Phys.* **1990**, 140, 75.
- (216) Brouwer, A. M. *Pure Appl. Chem.* **2011**, 83, 2213.
- (217) Schäfer, F. P. *Topics in Applied Physics: Structure and Properties of Laser Dyes* **1990**; Vol. 1.
- (218) Lide, D. R. *Handbook of Chemistry and Physics* **1957**.
- (219) Vo-Dinh, T. *Biomedical Photonics Handbook* **2003**.
- (220) Cheong, W.-F.; Prahl, S. A.; Welch, A. J. *IEEE J. Quantum Electron.* **1990**, 26, 2166.

ANNEXES

Annexe 1 : Propriétés de réfraction, de diffusion et d'autofluorescence des tissus

Tableau 1 : indices de réfraction de différents tissus chez l'humain, classés dans l'ordre croissant.²¹⁹

Tissus	Longueur d'onde (nm)	Indice de réfraction
Fluide céphalo-rachidien	400-700	1.335
Cerveau		
Matière grise	456-1064	1.36
Matière blanche	456-1064	1.38
Colon (muqueuse)	456-1064	1.38
Rein	456-1064	1.37
Muscle	456-1064	1.37
Vessie (muqueuse)	456-1064	1.37
Cœur (myocarde)	456-1064	1.38
Foie	456-1064	1.38
Poumon	456-1064	1.38
Estomac (muqueuse)	456-1064	1.38
Oeil (lentille)	400-700	1.41
Veine	456-1064	1.39
Sang	633	1.44
Graisse	456-1064	1.46
Ongle	842-858	1.51
Peau	400-700	1.55
Cheveux		
Roux	850	1.56
Noir	850	1.59
Dent	400-700	1.62
Os	400-700	1.63

Tableau 2 : coefficients de diffusion et facteur d'anisotropie de différents tissus chez l'humain.²²⁰

Tissu	Longueur d'onde (λ) (nm)	Coefficient de diffusion (μ_s)	Facteur d'anisotropie (g)
Foie	635	313	0.68
Peau	633	187	0.81
Aorte	633	41.0	0.87
Vessie	633	29.3	0.91
Poumon	630	35.9	0.95
Cerveau			
Matière grise	633	51.0	0.96
Matière blanche	633	60.2	0.88
Cœur (endocarde)	1060	136	0.97
Sang	685	1413	0.99

Il est à noter que ces valeurs dépendent des conditions expérimentales et des algorithmes utilisés pour les calculer.

Tableau 3 : maxima d'excitation et d'émission de molécules biologiques montrant une fluorescence endogène

Fluorophores endogènes	Maxima d'excitation (nm)	Maxima d'émission (nm)
Acides aminés		
Tryptophane	280	350
Tyrosine	275	300
Phénylalanine	260	280
Protéines structurelles		
Collagène	325	400, 405
Elastine	290, 325	340, 400
Enzymes et coenzymes		
FAD, flavines	450	535
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
Vitamines		
Vitamine A	327	510
Vitamine K	335	480
Vitamine D	390	480
Dérivés de la vitamine B ₆		
Pyridoxine	332, 340	400
Pyridoxamine	335	400
pyridoxal	330	385
Acide pyridoxique	315	425
pyridoxal 5'-phosphate	330	400
Vitamine B ₁₂	275	305
Lipides		
Phospholipides	436	540, 560
Lipofuscine	340-395	540, 430-460
Céroïde	340-395	430-460, 540
Porphyrines	400-450	630, 690

Annexe 2 : "Supporting Information" de l'article I

Boron Functionalization of BODIPY by various Alcohols and Phenols

Bertrand Brizet, Yulia A. Volkova, Yoann Rousselin, Pierre D. Harvey, Christine
Goze*, Franck Denat*

Table of figures:

Figure 1: ^1H NMR spectrum of compound 1 in CDCl_3	259
Figure 2: ^1H NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3	260
Figure 3: ^{13}C NMR spectrum of compound 2 in CDCl_3	260
Figure 4: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of 2 in 2-MeTHF at room temperature.	261
Figure 5: ^1H NMR spectrum of compound 3 in CDCl_3	261
Figure 6: ^{13}C NMR spectrum of compound 3 in CDCl_3	262
Figure 7: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of 3 in 2-MeTHF at room temperature.	262
Figure 8: ^1H NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3	263
Figure 9: ^{13}C NMR spectrum of compound 4 in CDCl_3	263
Figure 10: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 690$ nm) spectra of 4 in 2-MeTHF at room temperature.	264
Figure 11: ^1H NMR spectrum of compound 5 in CDCl_3	264
Figure 12: ^1H NMR spectrum of compound 6 in CDCl_3	265
Figure 13: ^{13}C NMR spectrum of compound 6 in CDCl_3	265
Figure 14: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 690$ nm) spectra of 6 in 2-MeTHF at room temperature.	266
Figure 15: ^1H NMR spectrum of compound 7 in CDCl_3	266
Figure 16: ^1H NMR spectrum of compound 8 in CDCl_3	267
Figure 17: ^{13}C NMR spectrum of compound 8 in CDCl_3	267
Figure 18: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of 8 in 2-MeTHF at room temperature.	268
Figure 19: ^1H NMR spectrum of compound 9 in CDCl_3	268
Figure 20: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of 9 in 2-MeTHF at room temperature.	269
Figure 21: ^1H NMR spectrum of compound 10 in CDCl_3	269
Figure 22: ^{13}C NMR spectrum of compound 11 in CDCl_3	270

Figure 23: Absorption (black), fluorescence (red, λ_{ex} = 470 nm) and excitation (blue, λ_{em} = 620 nm) spectra of 11 in 2-MeTHF at room temperature.....	270
Figure 24: ^1H NMR spectrum of compound 12 in CDCl_3	271
Figure 25: ^{13}C NMR spectrum of compound 12 in CDCl_3	271
Figure 26: Absorption (black), fluorescence (red, λ_{ex} = 470 nm) and excitation (blue, λ_{em} = 690 nm) spectra of 12 in 2-MeTHF at room temperature.....	272
Figure 27: ^1H NMR spectrum of compound 13 in CDCl_3	272
Figure 28: ^{13}C NMR spectrum of compound 13 in CDCl_3	273
Figure 29: Absorption (black), fluorescence (red, λ_{ex} = 470 nm) and excitation (blue, λ_{em} = 620 nm) spectra of 13 in 2-MeTHF at room temperature.....	273
Figure 30: ^1H NMR spectrum of compound 14 in CDCl_3	274
Figure 31: ^{13}C NMR spectrum of compound 14 in CDCl_3	274
Figure 32: Absorption (black), fluorescence (red, λ_{ex} = 550 nm) and excitation (blue, λ_{em} = 700 nm) spectra of 14 in 2-MeTHF at room temperature.....	275
Figure 33: ^1H NMR spectrum of compound 15 in CDCl_3	275
Figure 34: ^1H NMR spectrum of compound 16 in CDCl_3	276
Figure 35: View of crystal packing in 3	284

Characterization of compounds 1-16 : NMR and photophysical spectra

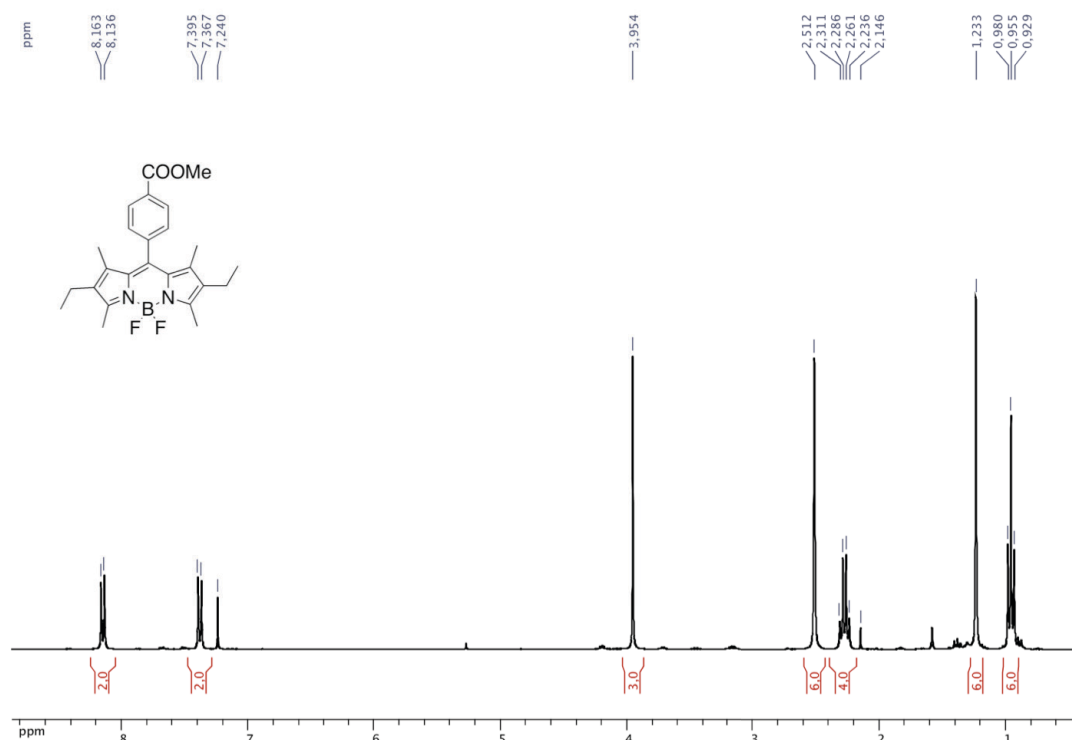


Figure 1: ^1H NMR spectrum of compound **1** in CDCl_3

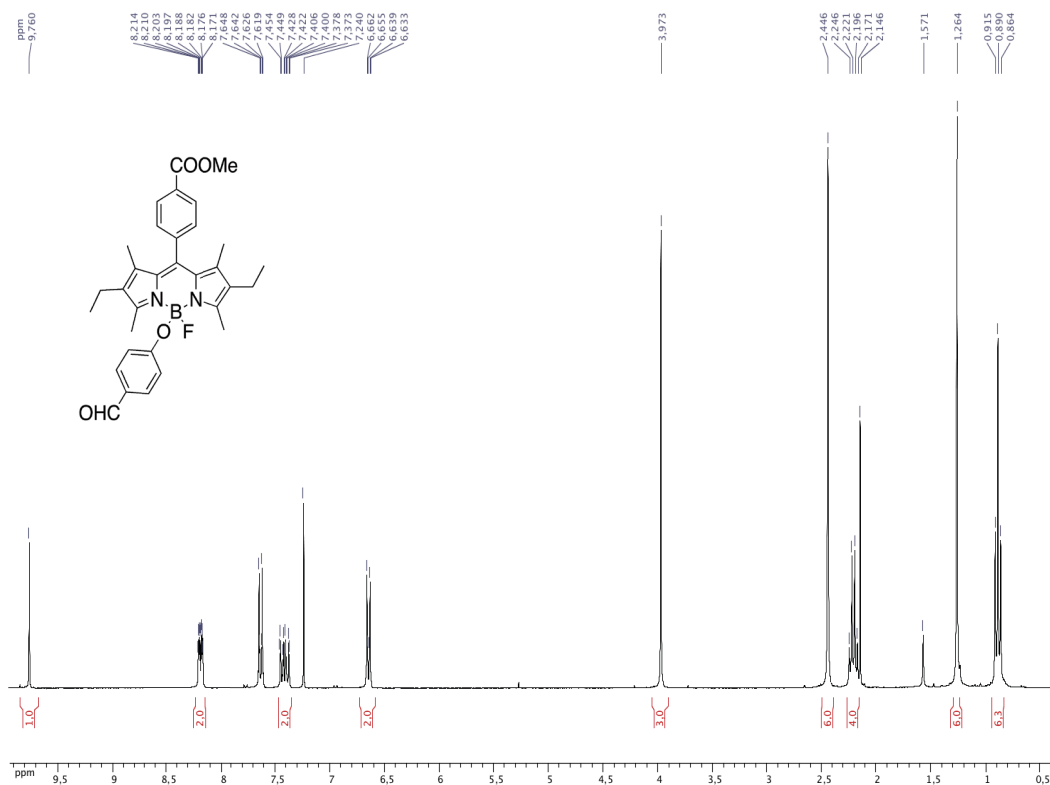


Figure 2: ¹H NMR spectrum of compound **2** in CDCl₃

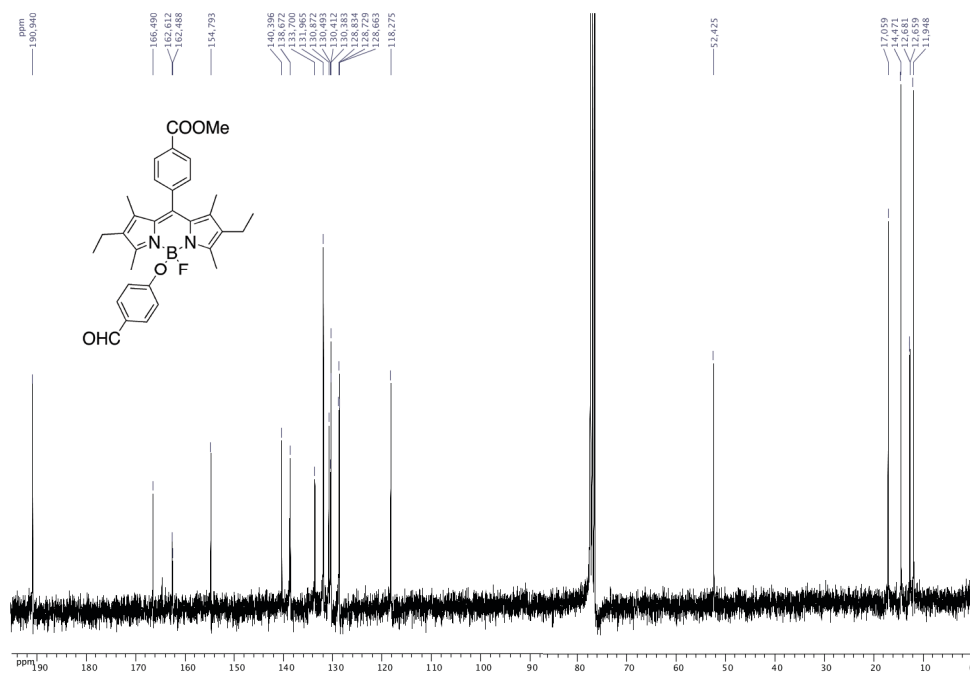


Figure 3: ¹³C NMR spectrum of compound **2** in CDCl₃

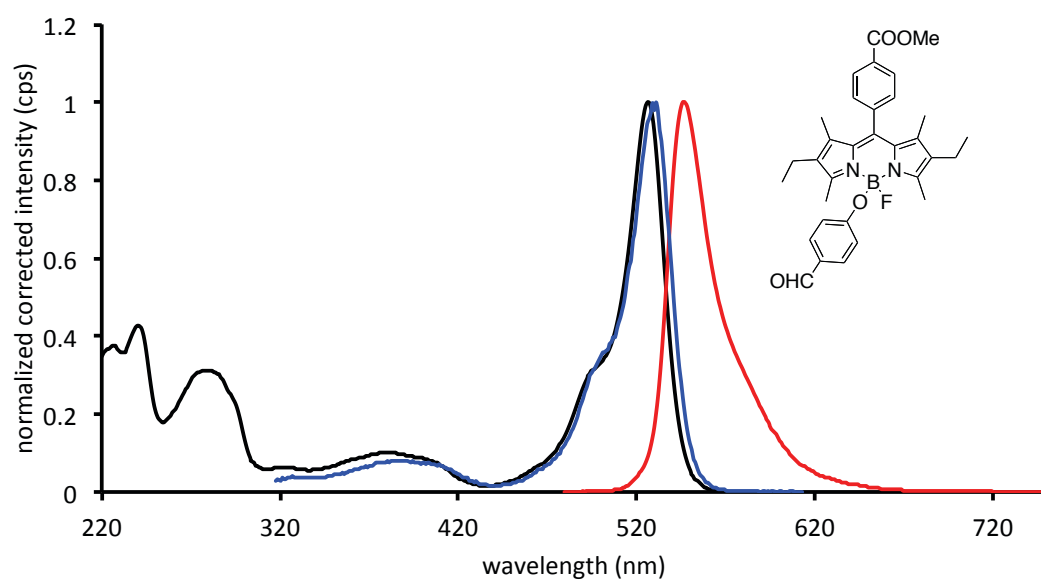


Figure 4: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of **2** in 2-MeTHF at room temperature.

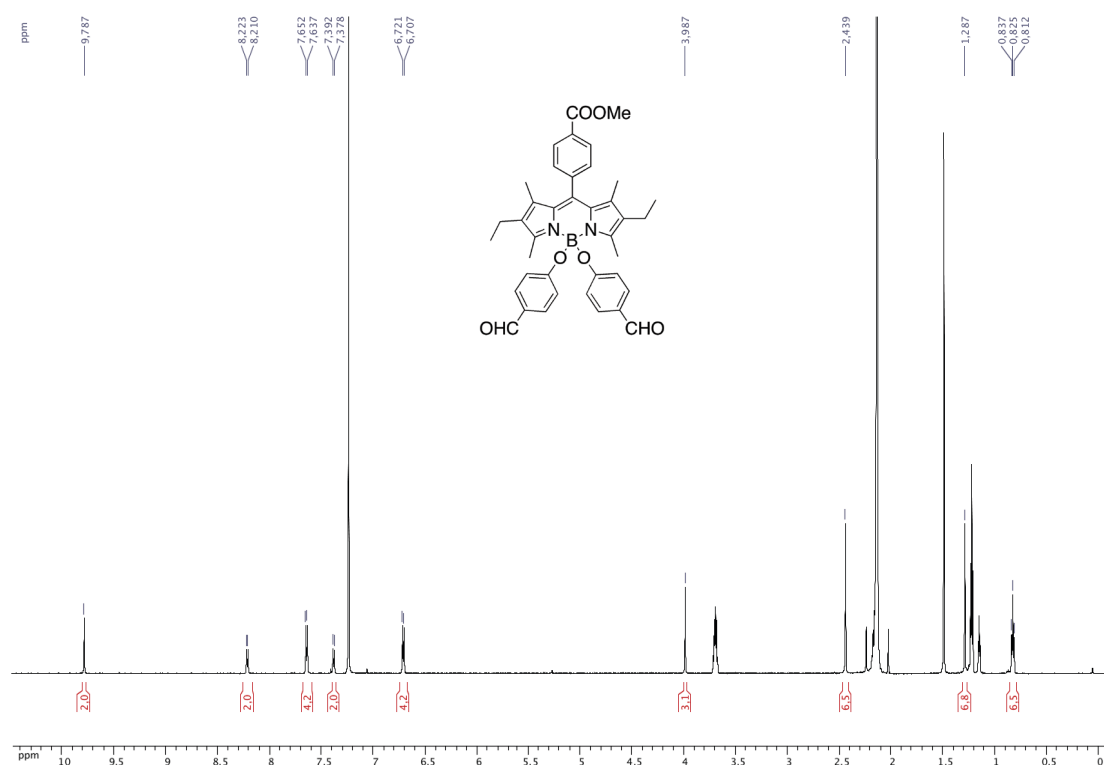
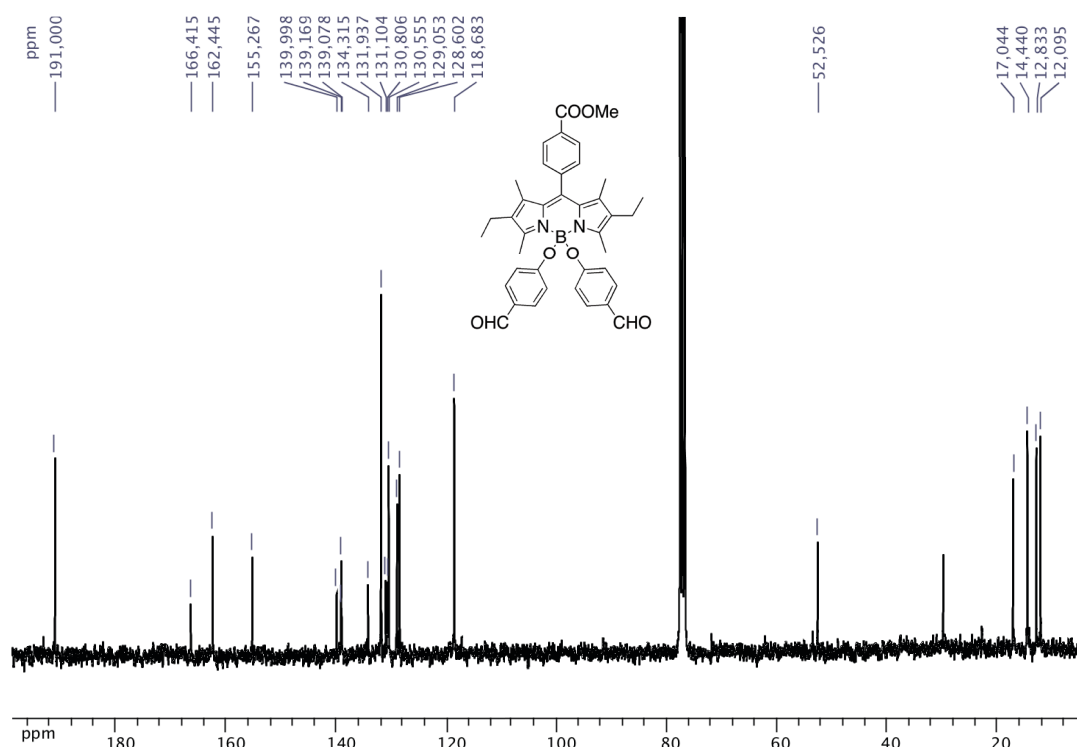
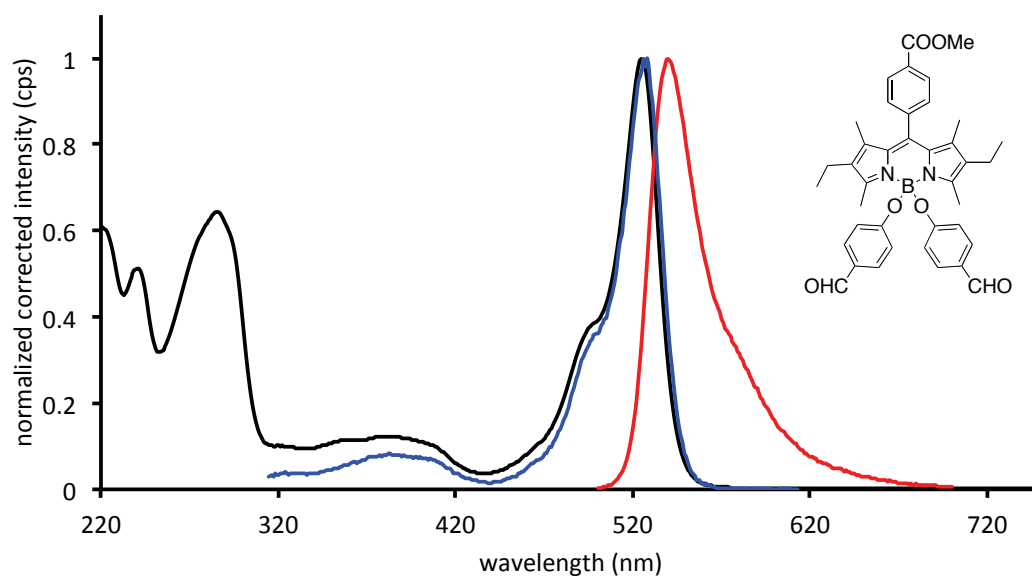
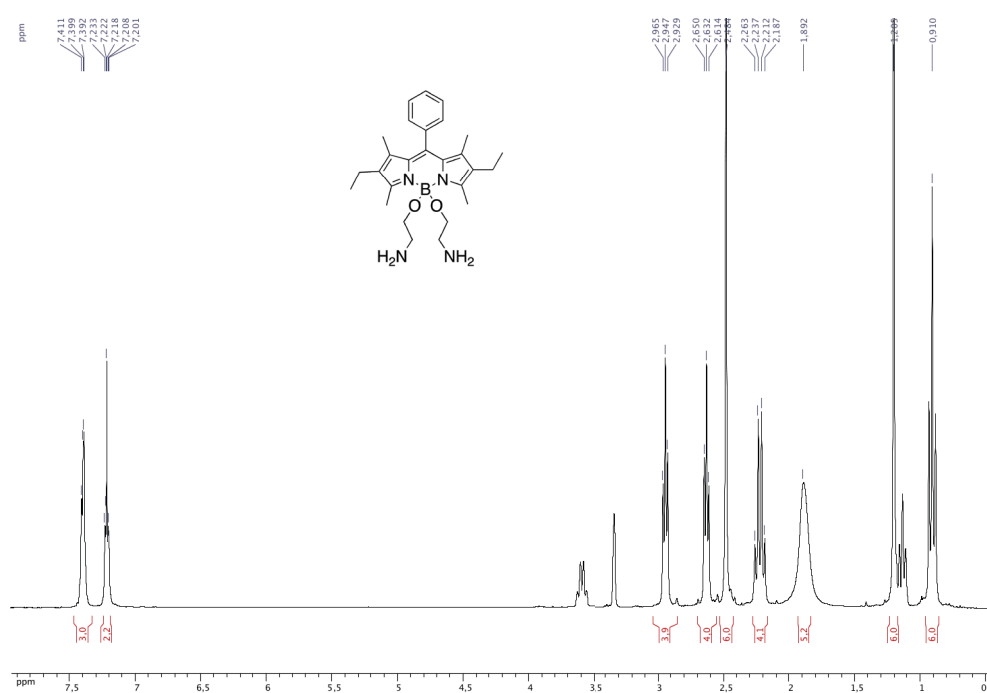
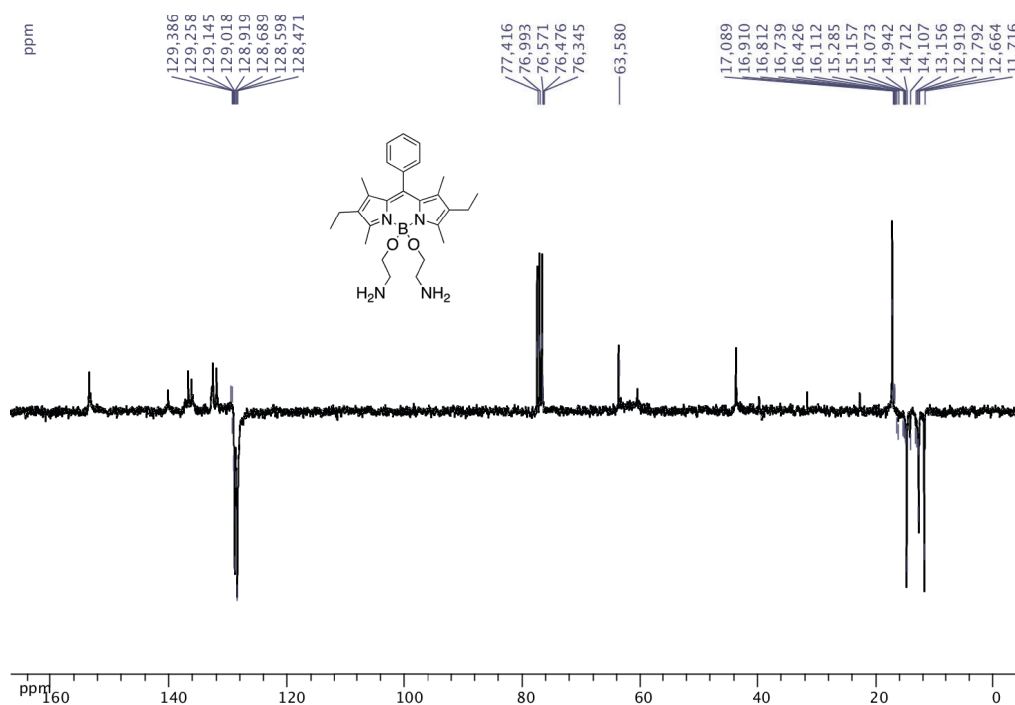


Figure 5: ^1H NMR spectrum of compound **3** in CDCl_3

Figure 6: ¹³C NMR spectrum of compound **3** in CDCl₃Figure 7: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of **3** in 2-MeTHF at room temperature.

Figure 8: ¹H NMR spectrum of compound **4** in CDCl₃Figure 9: ¹³C NMR spectrum of compound **4** in CDCl₃

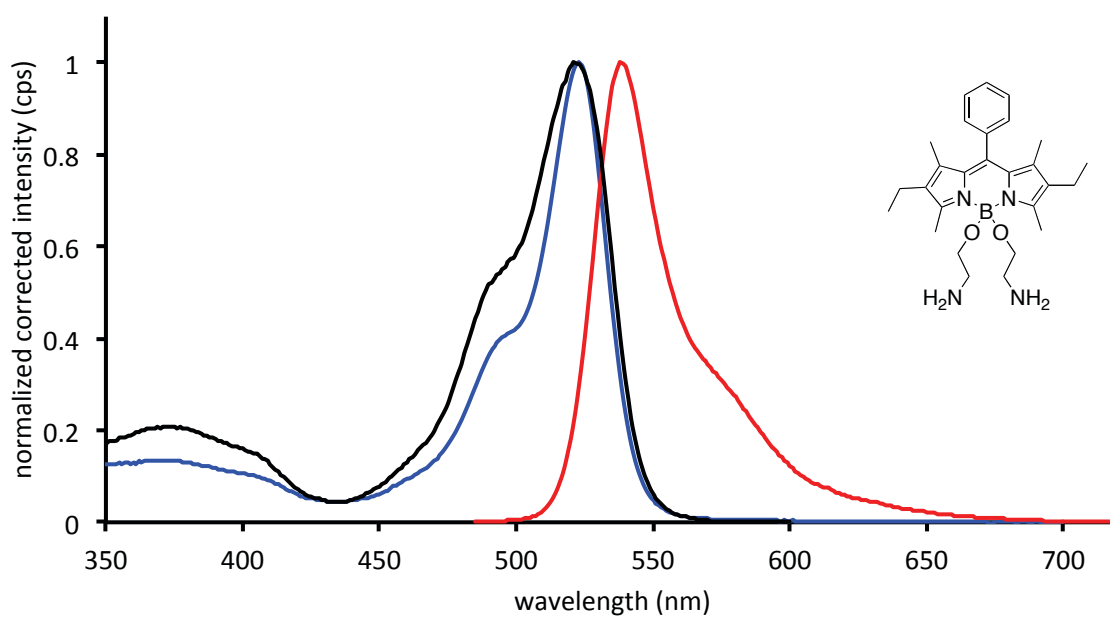


Figure 10: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 690$ nm) spectra of **4** in 2-MeTHF at room temperature.

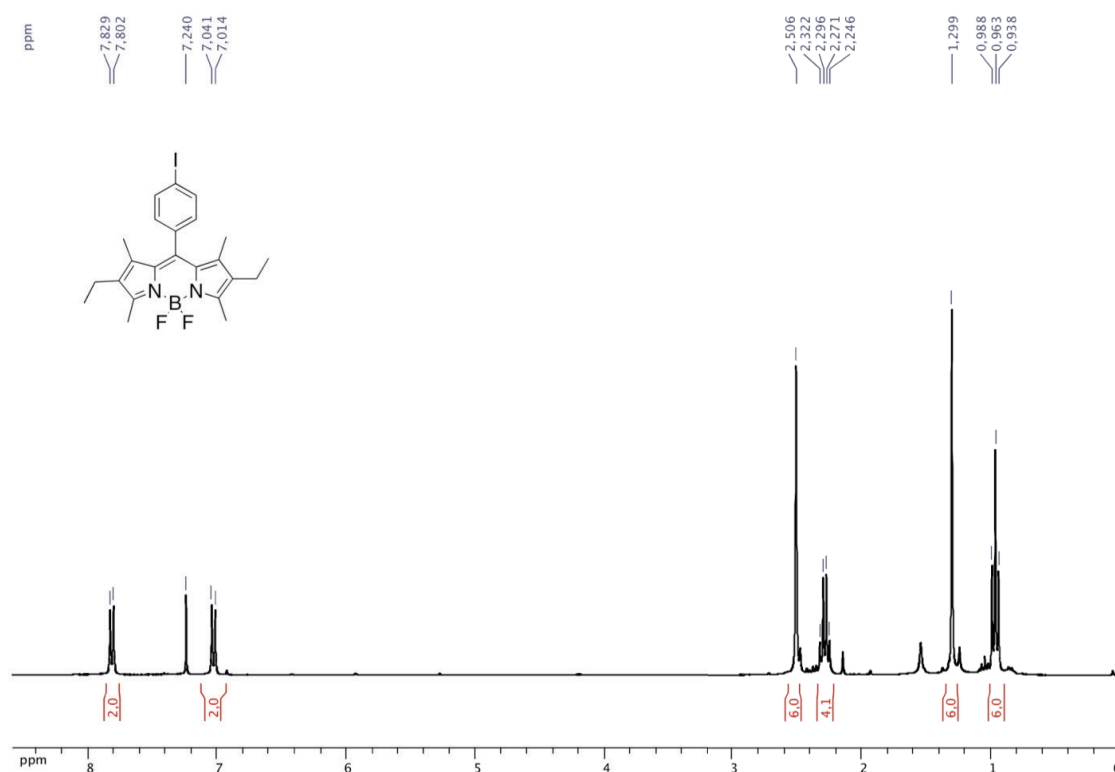
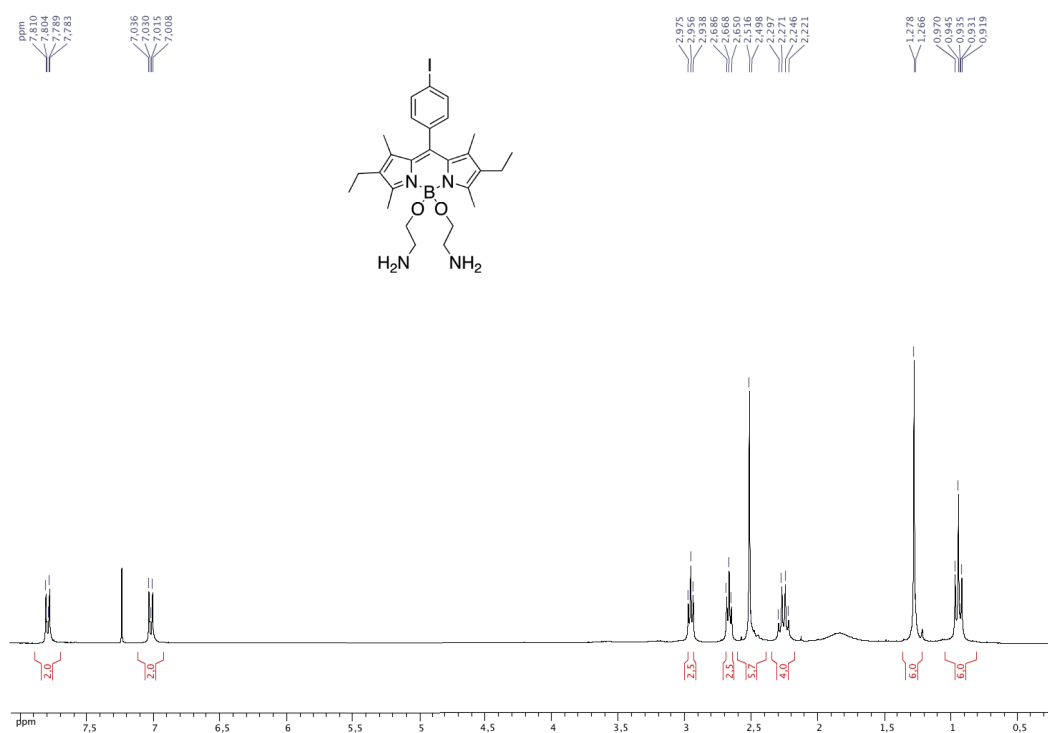
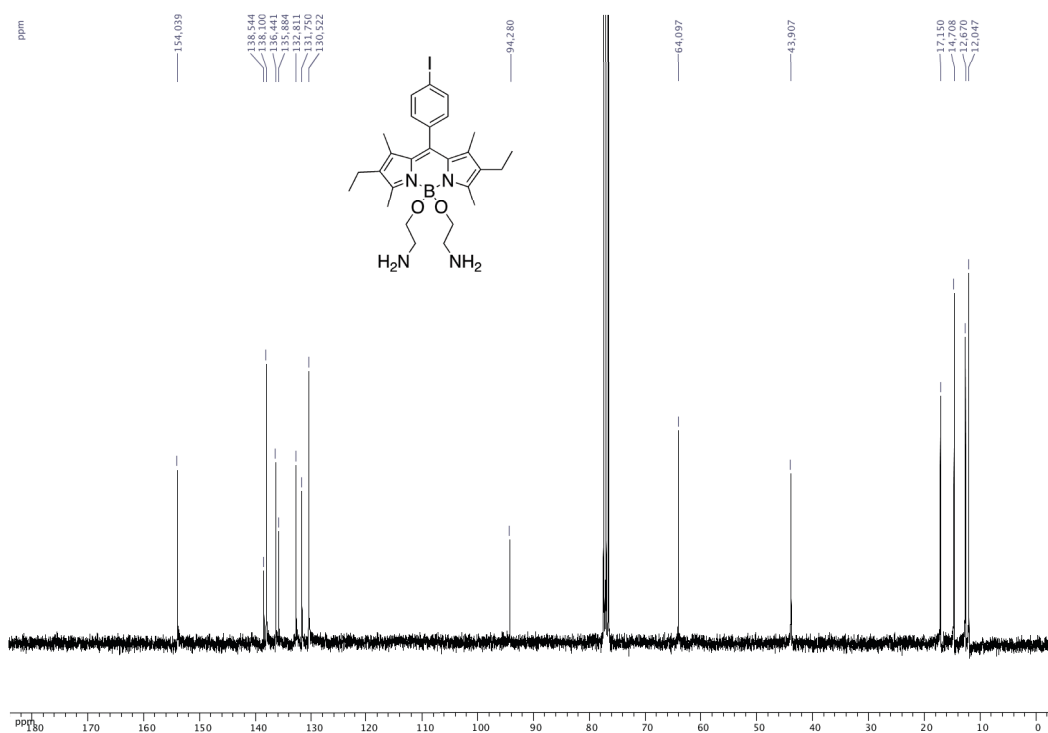


Figure 11: ^1H NMR spectrum of compound **5** in CDCl_3

Figure 12: ¹H NMR spectrum of compound **6** in CDCl₃Figure 13: ¹³C NMR spectrum of compound **6** in CDCl₃

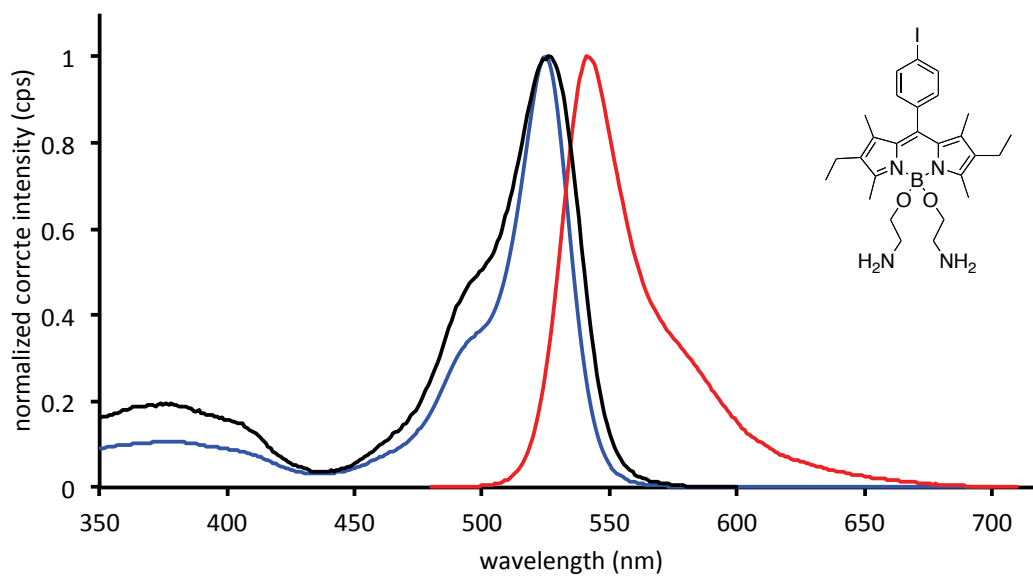


Figure 14: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 690$ nm) spectra of **6** in 2-MeTHF at room temperature.

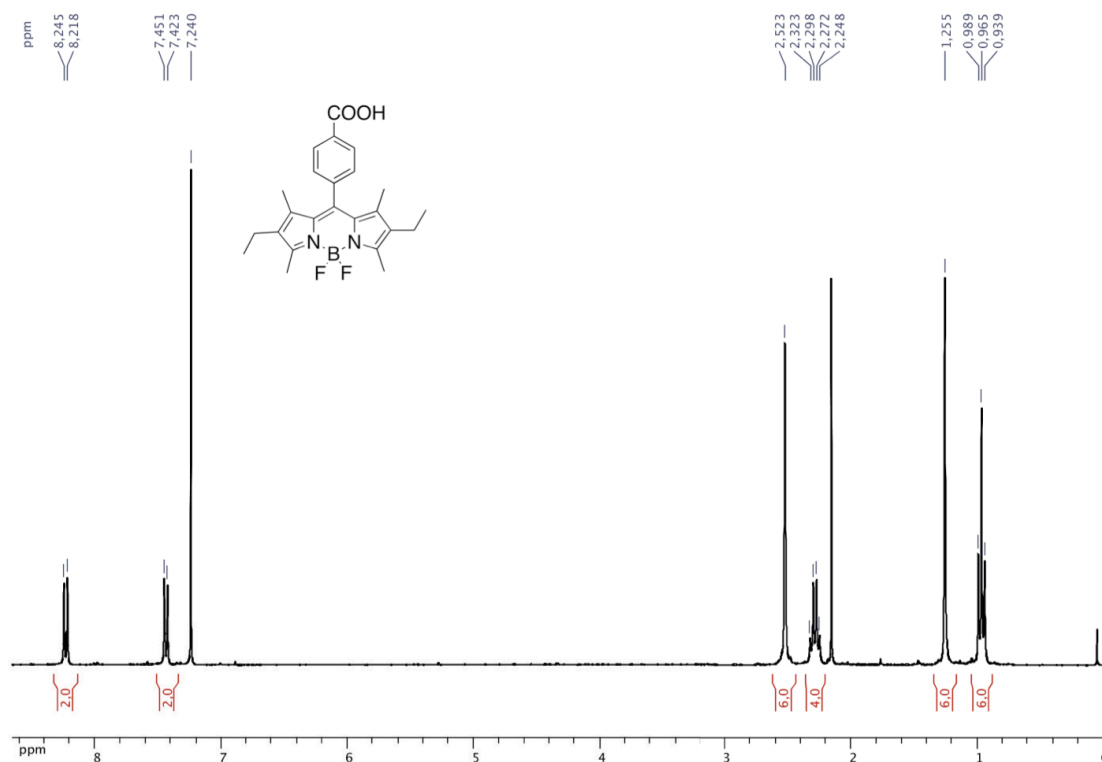
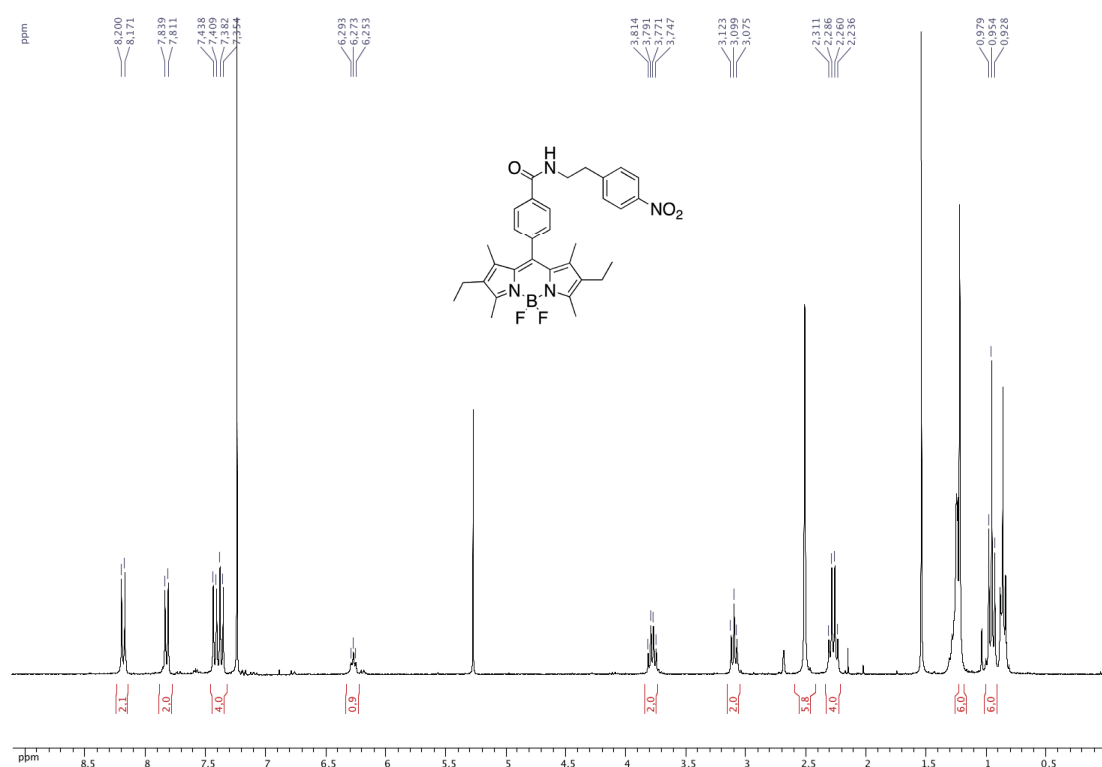
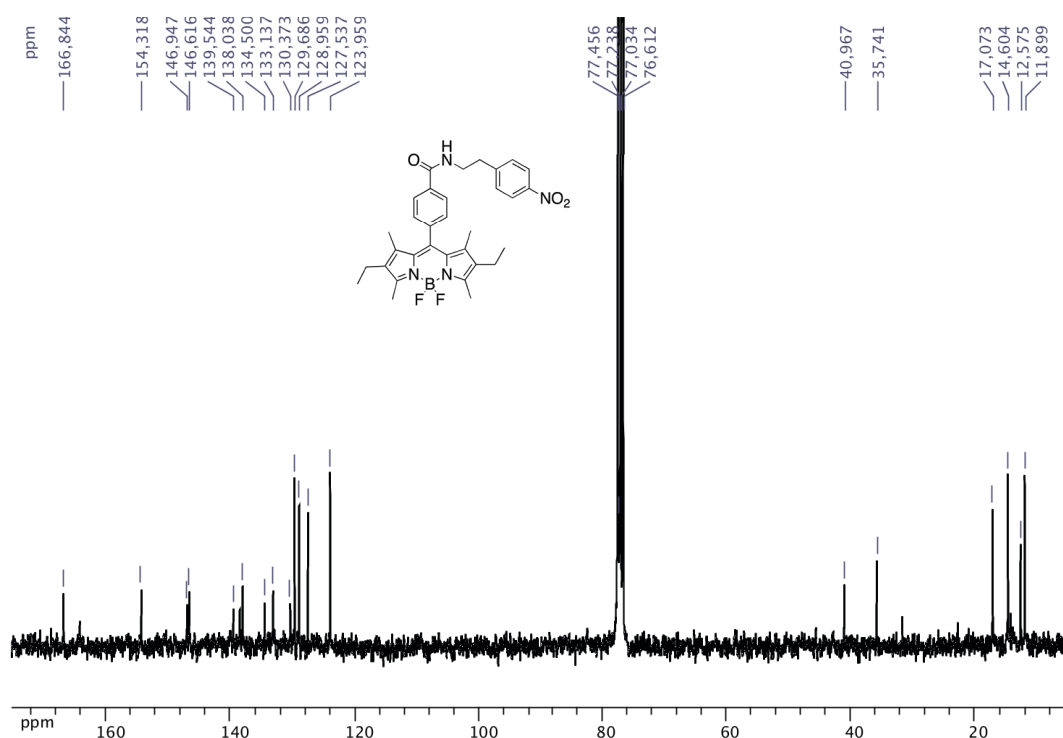


Figure 15: ^1H NMR spectrum of compound **7** in CDCl_3 .

Figure 16: ¹H NMR spectrum of compound **8** in CDCl₃Figure 17: ¹³C NMR spectrum of compound **8** in CDCl₃

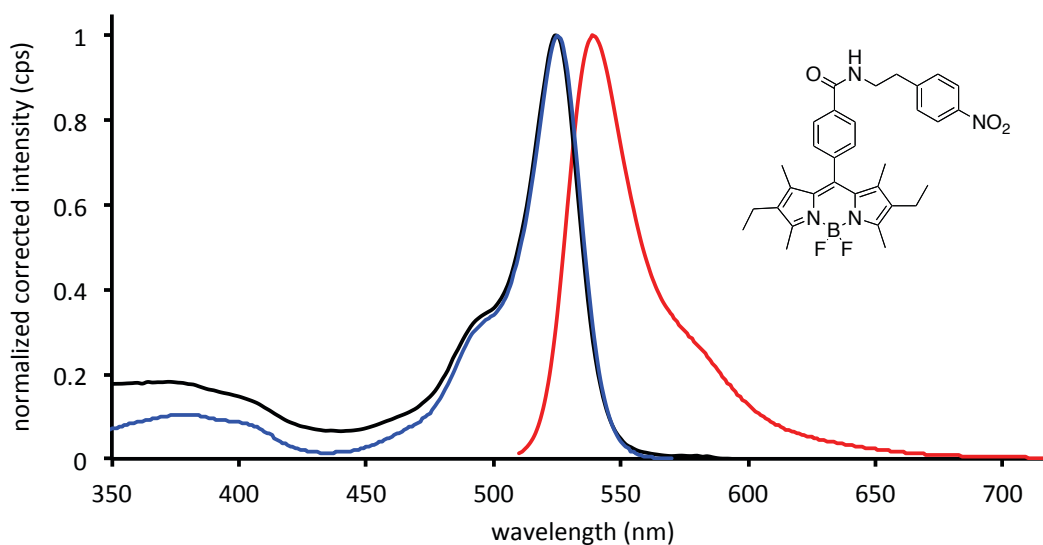


Figure 18: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of **8** in 2-MeTHF at room temperature.

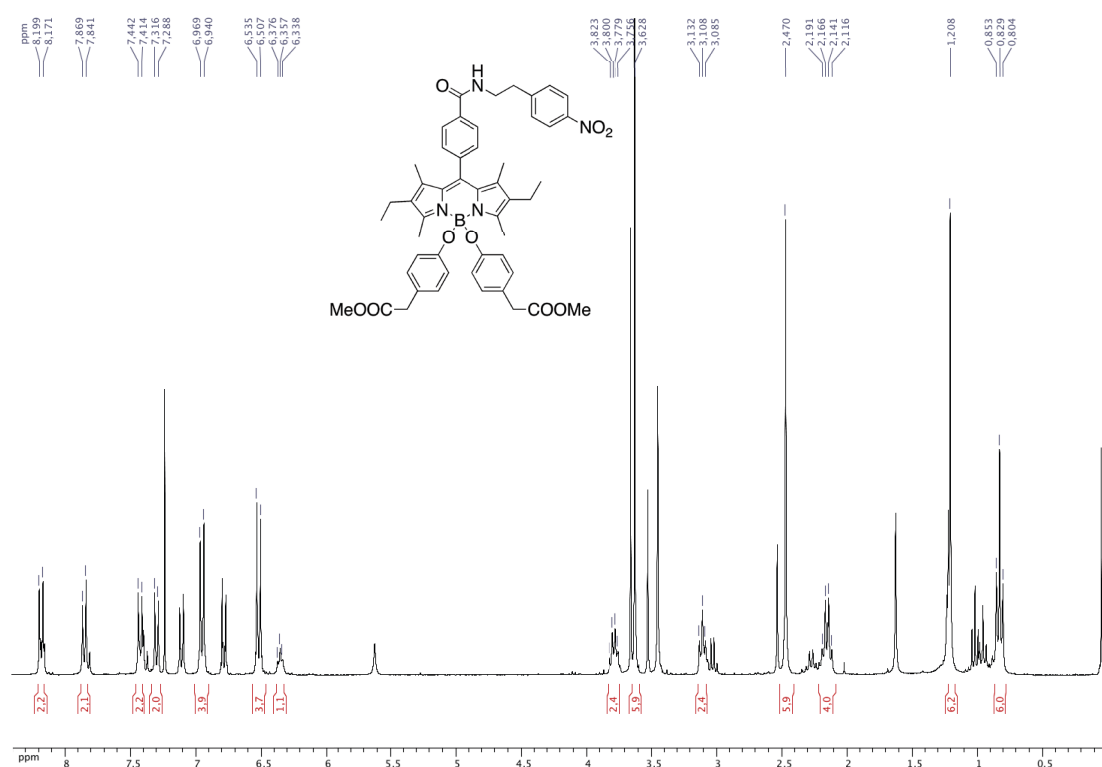


Figure 19: ^1H NMR spectrum of compound **9** in CDCl_3

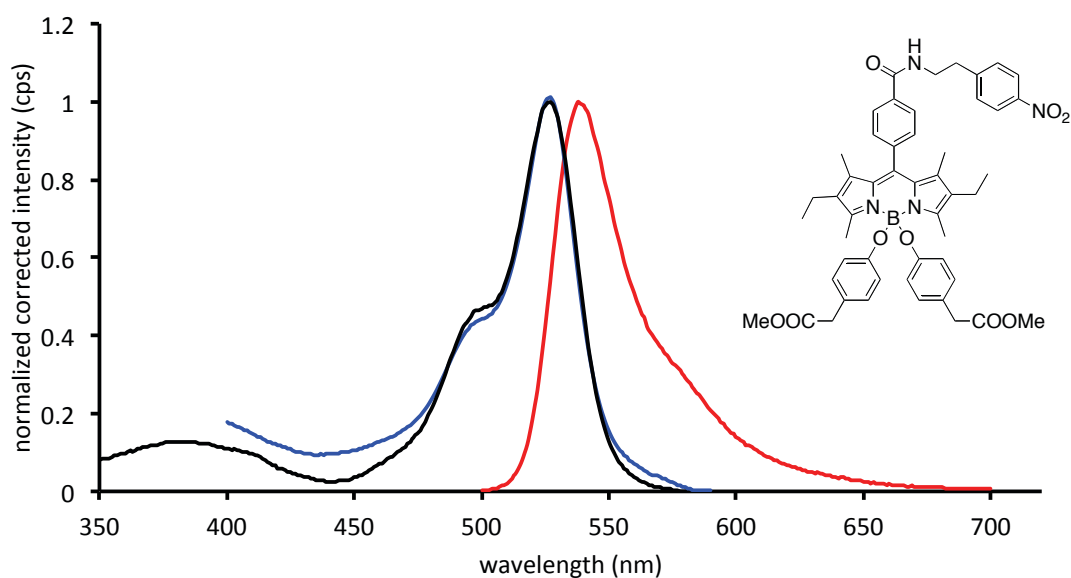


Figure 20: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of **9** in 2-MeTHF at room temperature.

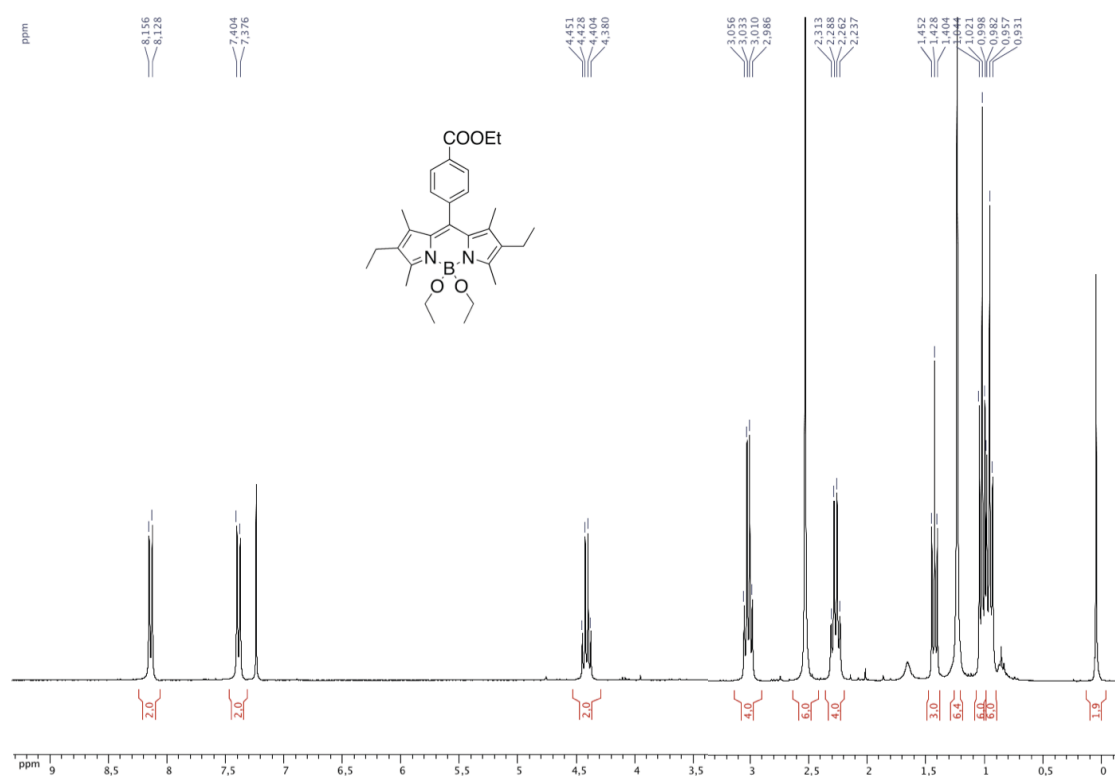
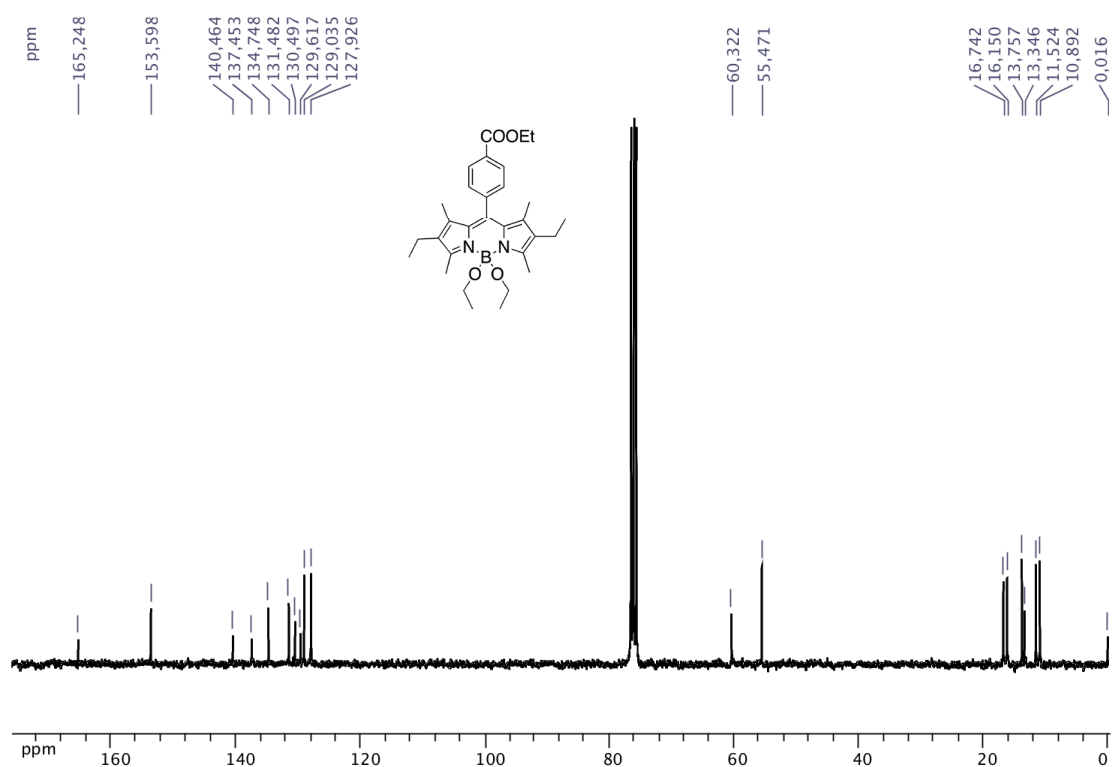
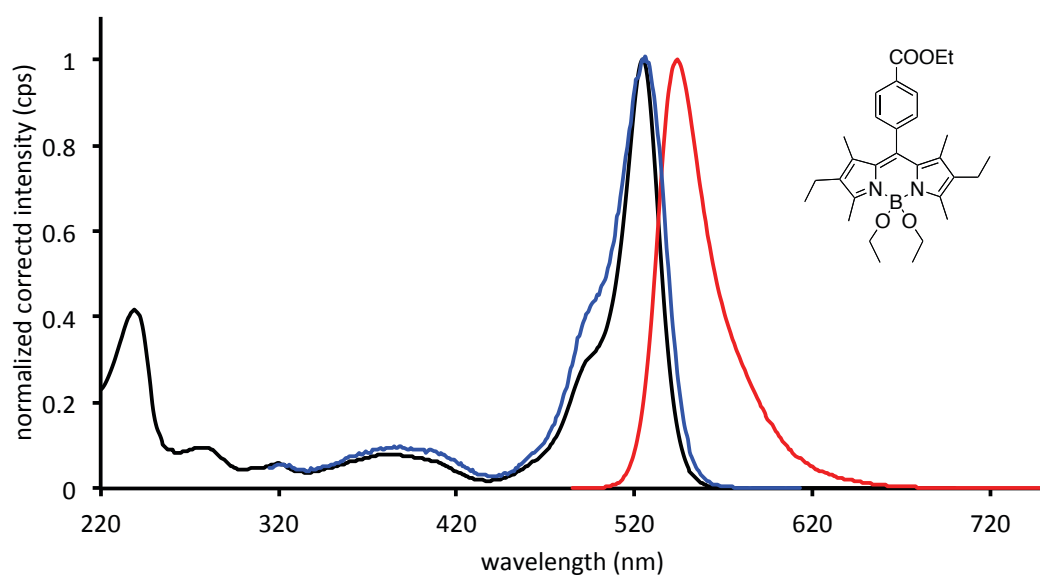
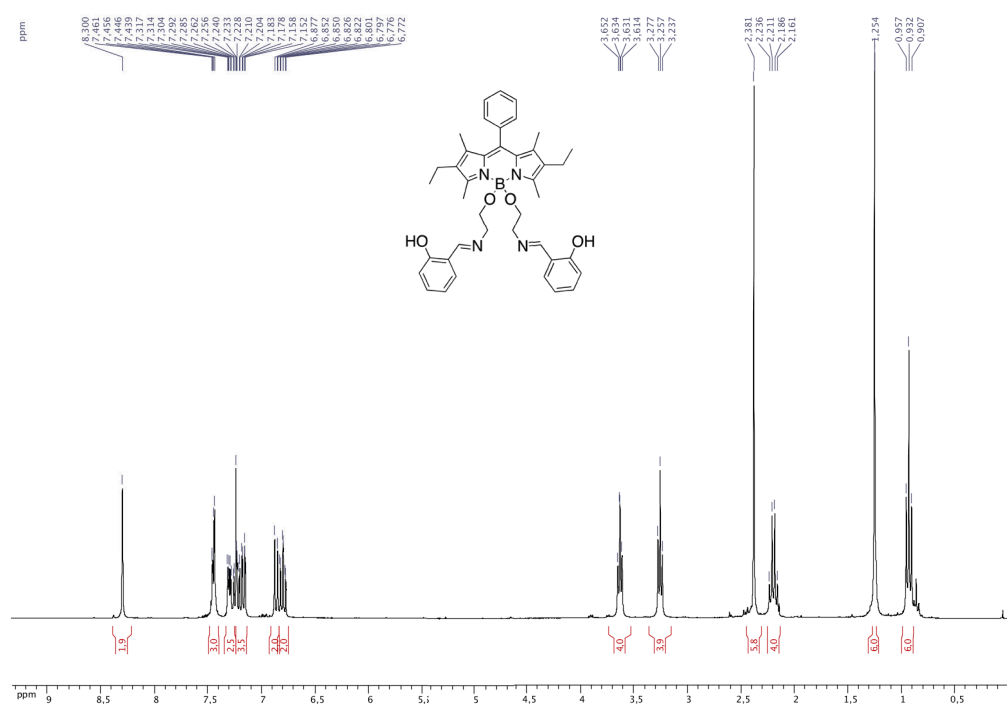
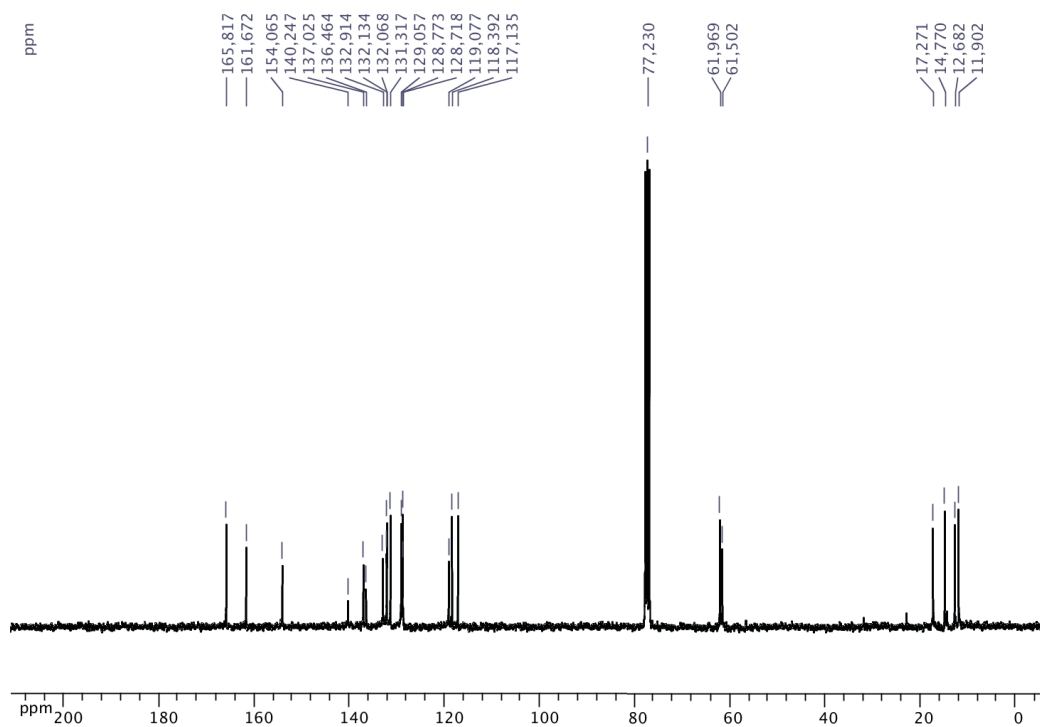


Figure 21: ^1H NMR spectrum of compound **10** in CDCl_3

Figure 22: ¹³C NMR spectrum of compound **11** in CDCl₃Figure 23: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of **11** in 2-MeTHF at room temperature.

Figure 24: ^1H NMR spectrum of compound **12** in CDCl_3 Figure 25: ^{13}C NMR spectrum of compound **12** in CDCl_3

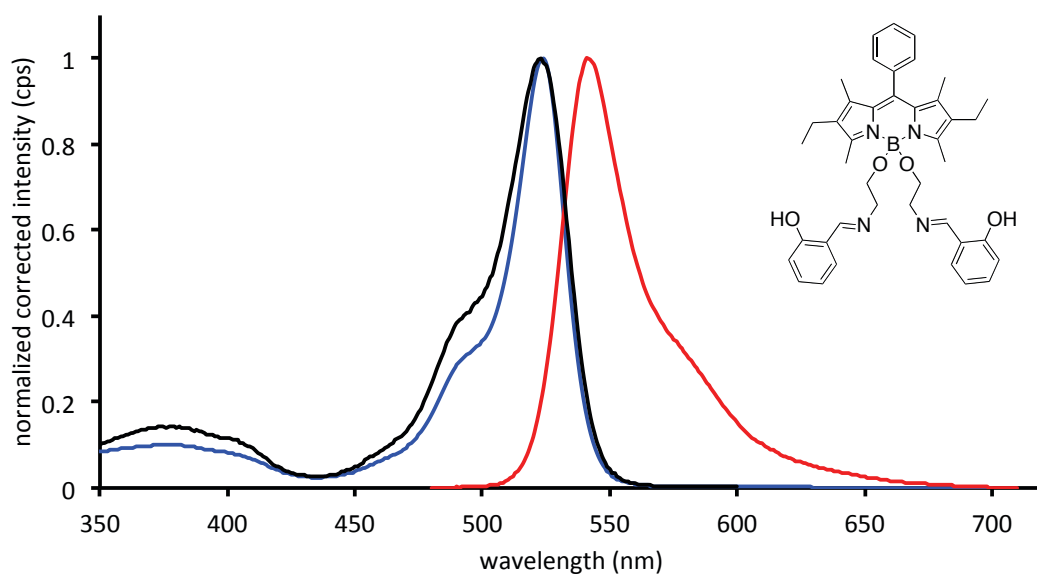


Figure 26: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 690$ nm) spectra of **12** in 2-MeTHF at room temperature.

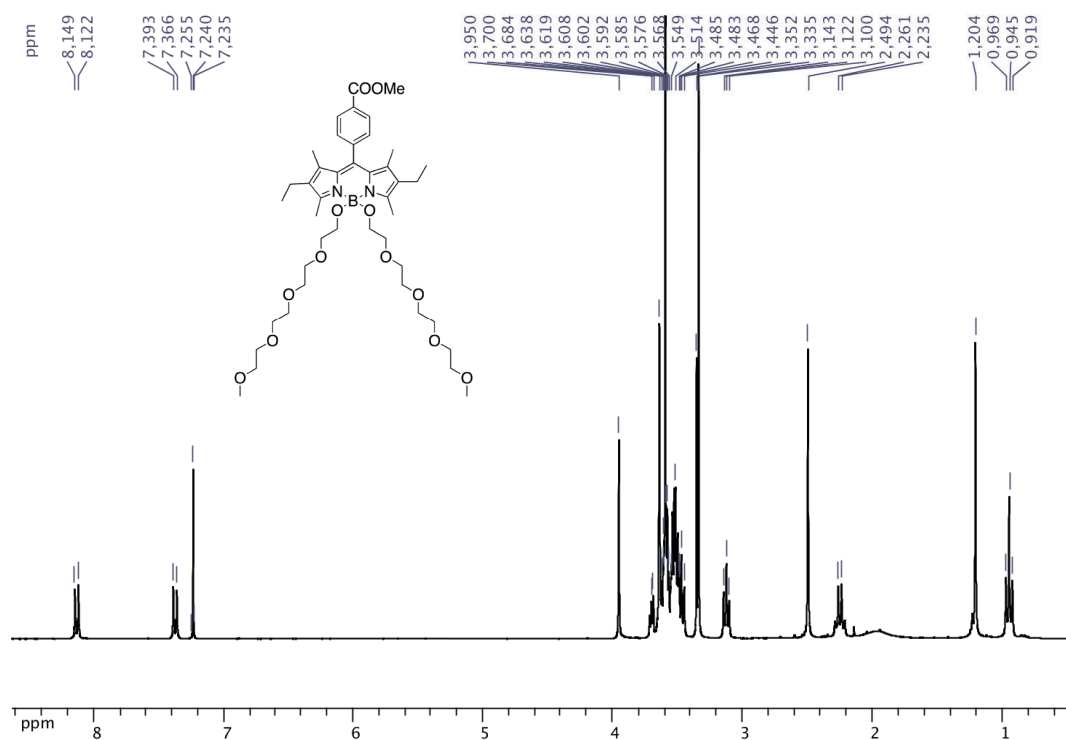
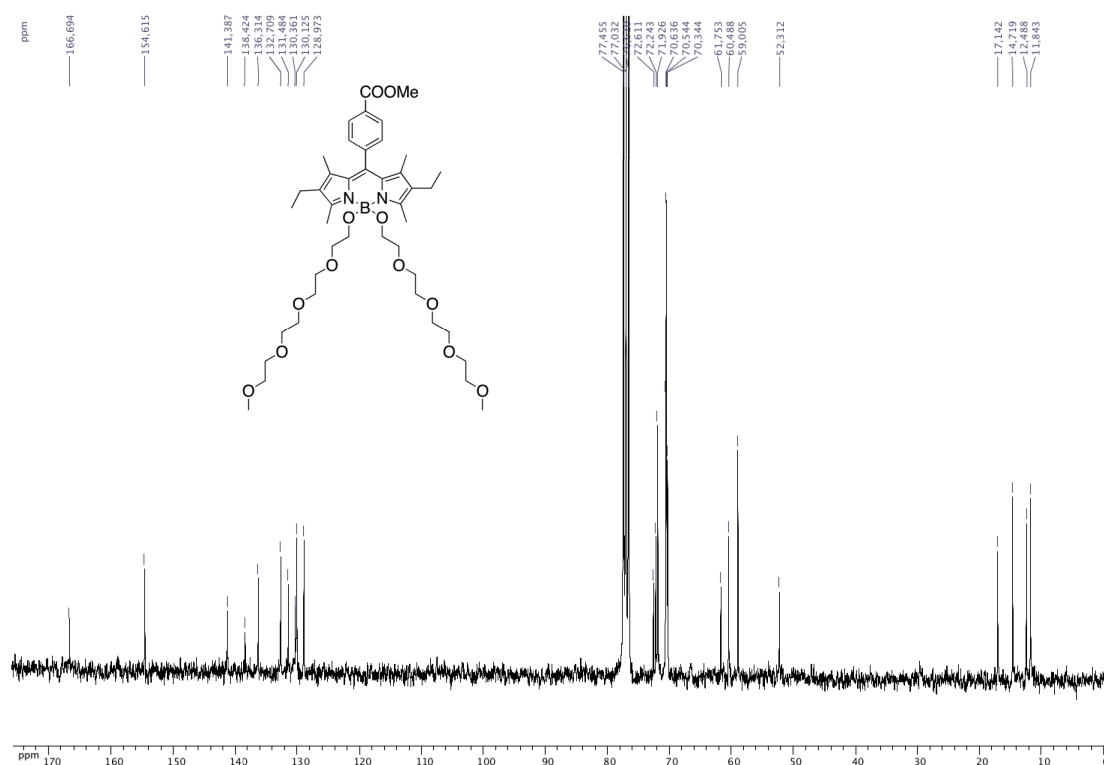
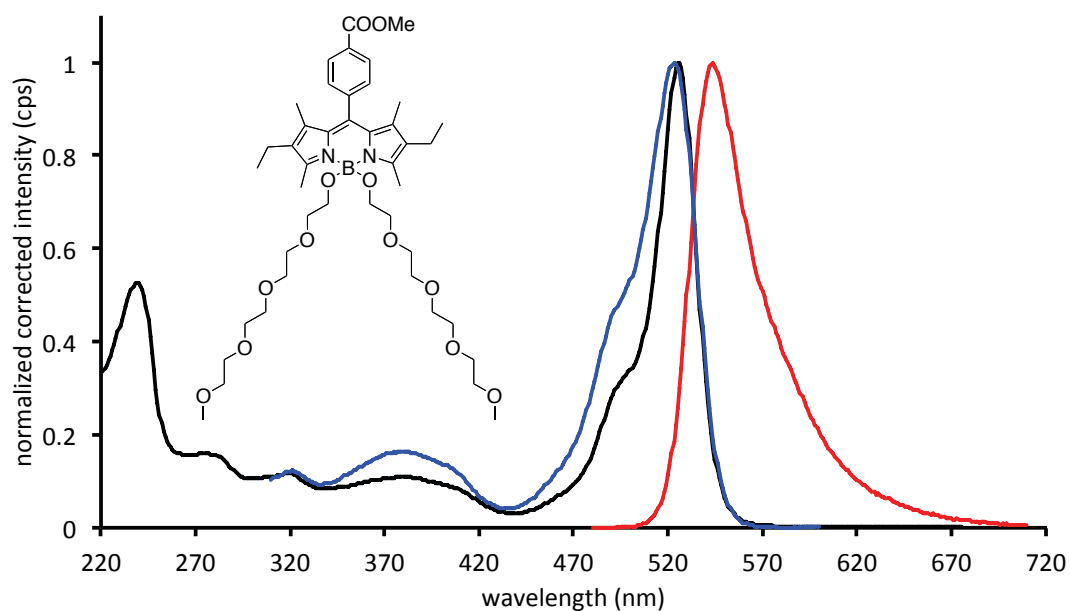


Figure 27: ^1H NMR spectrum of compound **13** in CDCl_3

Figure 28: ¹³C NMR spectrum of compound **13** in CDCl₃Figure 29: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of **13** in 2-MeTHF at room temperature.

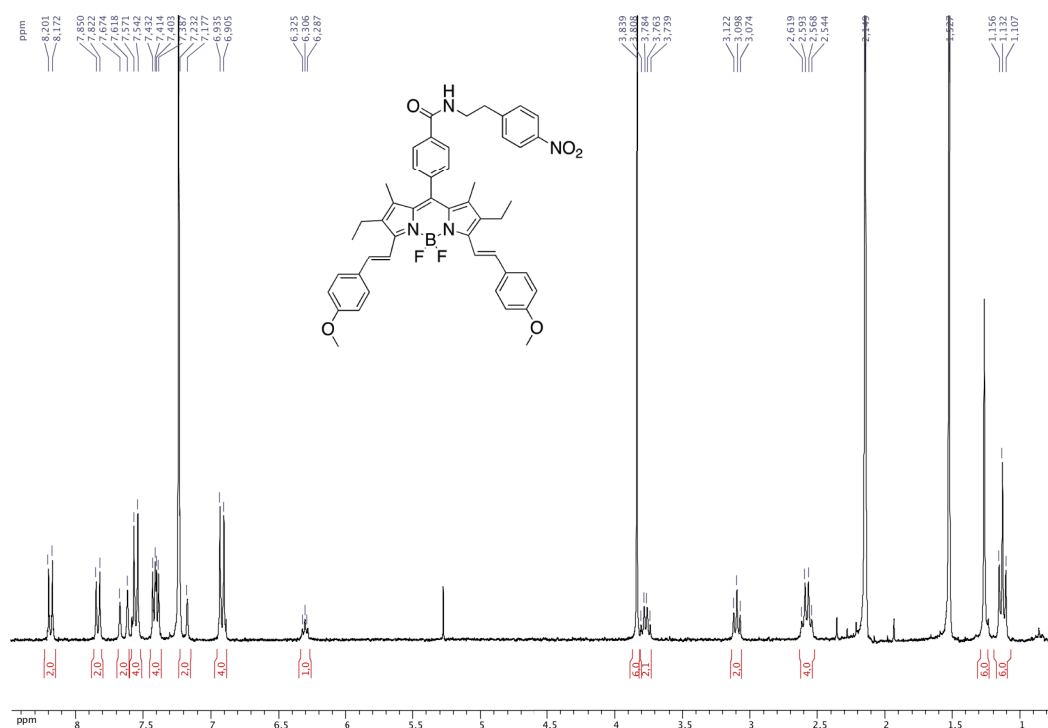


Figure 30: ^1H NMR spectrum of compound **14** in CDCl_3

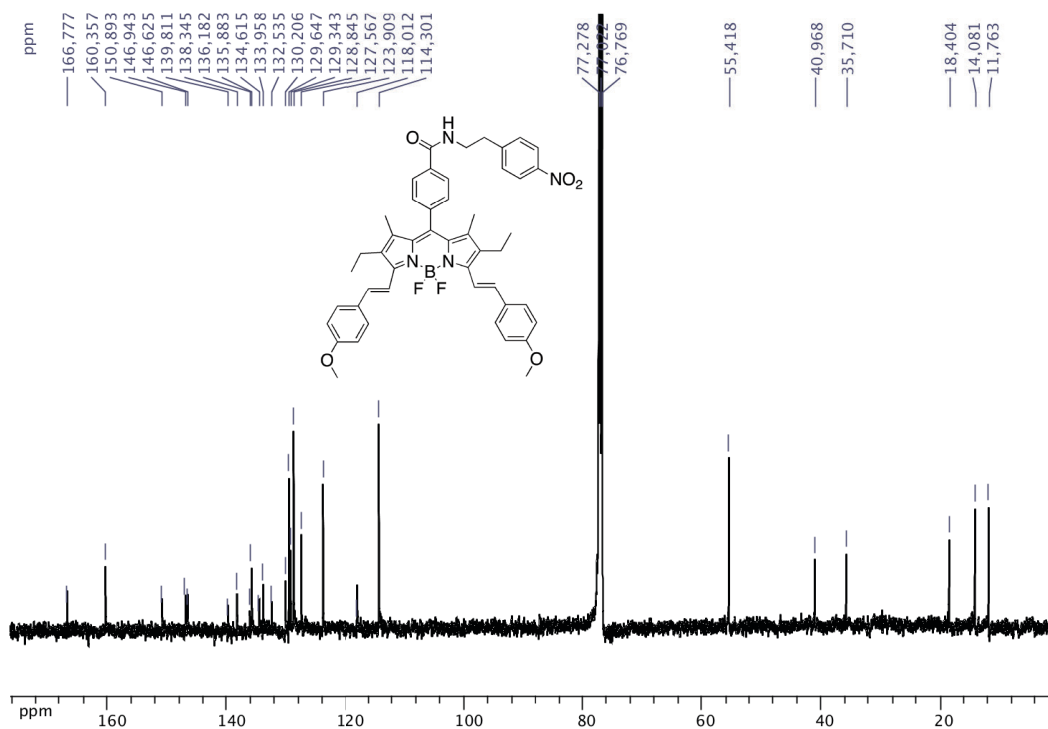


Figure 31: ^{13}C NMR spectrum of compound **14** in CDCl_3

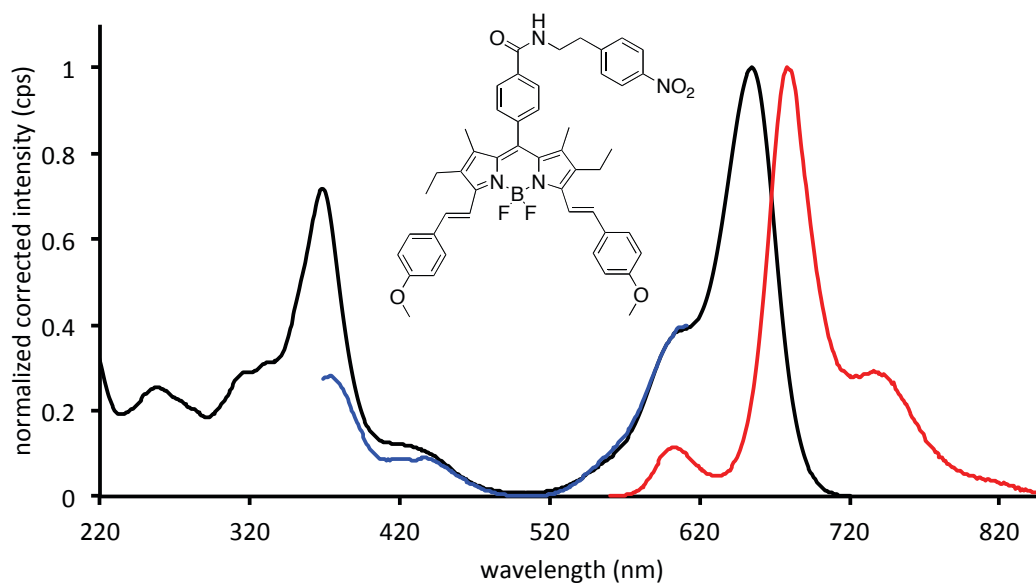


Figure 32: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 700$ nm) spectra of **14** in 2-MeTHF at room temperature.

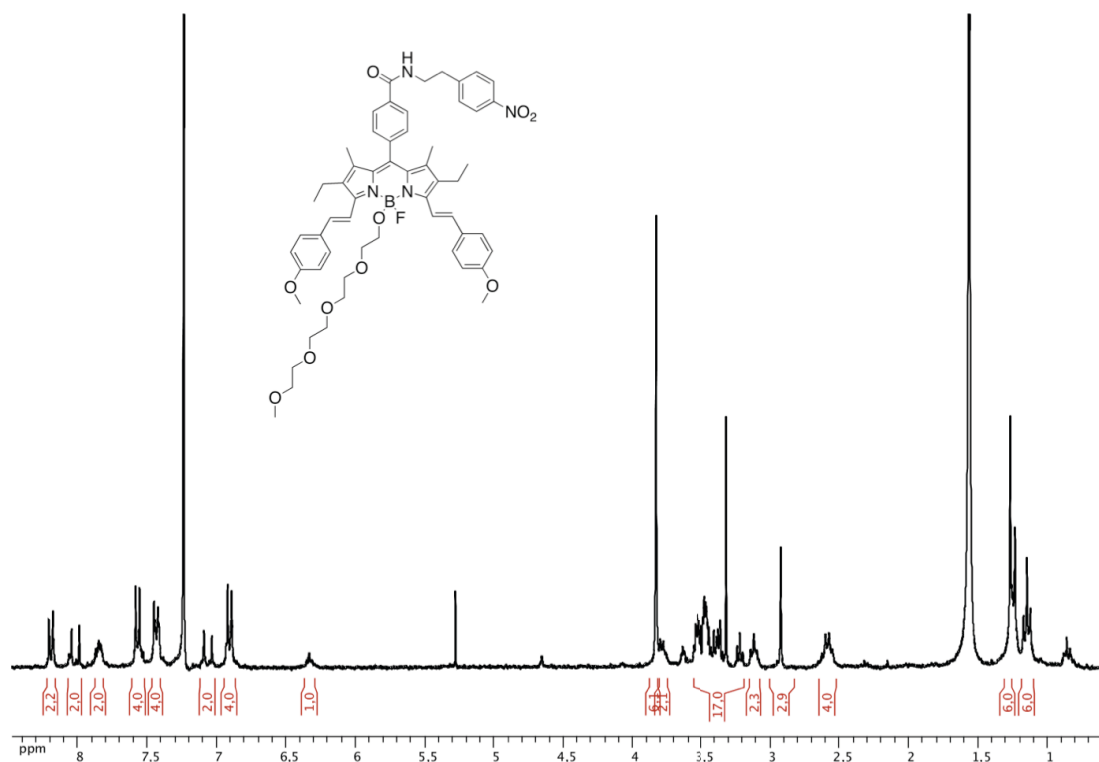


Figure 33: ^1H NMR spectrum of compound **15** in CDCl_3

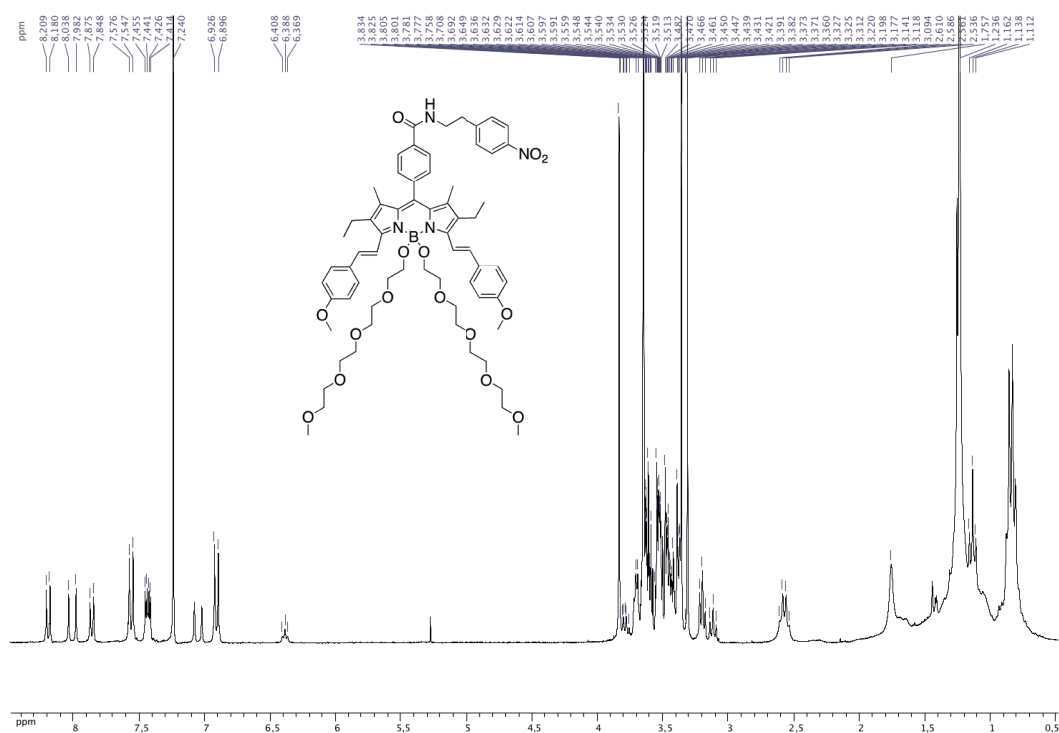


Figure 34: ^1H NMR spectrum of compound **16** in CDCl_3

X-Ray data of compound 3

X-ray equipment and refinement: diffraction data were collected on a Nonius Kappa Apex II diffractometer equipped with a nitrogen jet stream low-temperature system (Oxford Cryosystems). The X-ray source was graphite monochromated Mo-K α 1 radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) from a sealed tube. The lattice parameters were obtained by least-squares fit to the optimized setting angles of the entire set of collected reflections. No significant temperature drift was observed during the data collections. Data were reduced by using DENZO software without applying absorption corrections, the missing absorption corrections were partially compensated by the data scaling procedure in the data reduction. The structure was solved by direct method using the SIR92 program. Refinements were carried out by full-matrix least-squares on F^2 , using the SHELXL program on the complete set of reflections. Anisotropic thermal parameters were used for non-hydrogen atoms. All H atoms, on carbon atom or oxygen atom, were placed at calculated positions using a riding model with C-H = 0.95 (aromatic), 0.99 (methylene) or 0.98 (methyl) with $U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(CH)$, $U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(CH_2)$ or $U_{iso}(H) = 1.2U_{eq}(CH_3)$.

Table S1 Crystal data and structure refinement for **3**

Empirical formula	C ₃₉ H ₃₉ N ₂ O ₆ B
Formula weight	642.53
Temperature/K	115
Crystal system	triclinic
Space group	P-1
a/Å	10.8262(3)
b/Å	12.7507(4)
c/Å	14.1556(4)
$\alpha/^\circ$	86.5400(10)
$\beta/^\circ$	68.923(2)
$\gamma/^\circ$	65.630(2)
Volume/Å ³	1651.94(9)
Z	2
ρ_{calc} /mg/mm ³	1.292
μ /mm ⁻¹	0.086
F(000)	680.0
Crystal size/mm ³	0.25 × 0.25 × 0.12
2 θ range for data collection	3.1 to 55.06°
Index ranges	-14 ≤ h ≤ 14, -16 ≤ k ≤ 16, -18 ≤ l ≤ 18
Reflections collected	14266
Independent reflections	7527[R(int) = 0.0305]
Data/restraints/parameters	7527/0/440
Goodness-of-fit on F ²	1.068
Final R indexes [I ≥ 2 σ (I)]	R ₁ = 0.0521, wR ₂ = 0.1073
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0681, wR ₂ = 0.1172
Largest diff. peak/hole / e Å ⁻³	0.31/-0.22

Table S2 Fractional Atomic Coordinates ($\times 10^4$) and Equivalent Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for **3**. U_{eq} is defined as 1/3 of of the trace of the orthogonalised U_{ij} tensor.

Atom	x	y	z	$U(\text{eq})$
C1	666.3(18)	3511.9(15)	1759.8(13)	18.5(3)
C2	-560.1(18)	4418.9(15)	2449.4(13)	18.2(3)
C3	-730.5(17)	4080.4(14)	3425.5(12)	16.8(3)
C4	403.7(17)	2953.7(14)	3314.9(12)	15.9(3)
C5	755.2(17)	2183.0(14)	4023.2(12)	15.8(3)
C6	1929.6(17)	1095.0(14)	3723.0(12)	16.5(3)
C7	2501.0(17)	179.9(14)	4290.7(12)	17.0(3)
C8	3720.7(18)	-690.0(14)	3592.2(13)	17.6(3)
C9	3870.2(17)	-316.8(14)	2612.5(13)	17.4(3)
C10	4998.9(19)	-982.9(15)	1622.5(13)	21.4(4)
C11	4752.5(19)	-1799.5(15)	3816.8(14)	21.1(4)
C12	5857(2)	-1623.6(17)	4150.3(16)	29.6(4)
C13	1932.9(19)	114.8(15)	5418.7(12)	20.9(4)
C14	-1889.3(19)	4787.0(15)	4394.7(13)	21.2(4)
C15	-1498.3(19)	5515.1(15)	2132.4(14)	22.8(4)
C16	-2637(2)	5375.6(18)	1819.1(16)	30.9(4)
C17	1321(2)	3515.8(17)	634.0(13)	24.7(4)
C18	-127.4(17)	2525.5(14)	5135.9(12)	16.1(3)
C19	-1334.2(18)	2276.8(15)	5595.5(13)	19.5(3)
C20	-2118.0(19)	2553.1(15)	6633.2(13)	20.2(3)
C21	-1716.1(18)	3093.1(14)	7222.0(12)	16.9(3)
C22	-512.4(19)	3350.2(16)	6760.4(13)	21.9(4)
C23	275.7(19)	3064.0(16)	5726.7(13)	20.6(4)
C24	-2578.1(19)	3453.7(15)	8335.3(13)	20.0(3)
C25	-4630(2)	3465.4(17)	9725.1(13)	28.2(4)
C26	4278.4(18)	2284.3(15)	2019.5(12)	17.8(3)
C27	3623.7(19)	3478.1(16)	2271.9(13)	22.6(4)
C28	4055(2)	3958.9(16)	2879.1(14)	23.9(4)
C29	5135.3(19)	3259.7(16)	3240.6(13)	22.4(4)
C30	5785(2)	2067.8(16)	2986.2(14)	25.1(4)
C31	5366.5(19)	1576.7(15)	2381.1(13)	22.2(4)
C32	5572(2)	3786.5(19)	3888.0(14)	28.7(4)
C33	1876.6(18)	329.2(15)	1032.4(12)	18.0(3)
C34	607.4(19)	474.5(16)	1869.0(13)	23.4(4)
C35	-142(2)	-173.6(17)	1858.3(14)	24.8(4)
C36	326.5(19)	-963.9(16)	1031.5(14)	23.2(4)
C37	1580(2)	-1097.0(16)	198.9(14)	25.1(4)
C38	2352.2(19)	-461.2(16)	205.3(13)	22.1(4)
C39	-480(2)	-1643.9(18)	1016.0(17)	31.5(4)
N1	1236.4(15)	2631.7(12)	2273.6(10)	16.5(3)
N2	2799.2(14)	746.2(12)	2691.1(10)	16.2(3)
O1	-2308.8(14)	3972.3(12)	8866.6(9)	26.4(3)
O2	-3689.8(14)	3145.4(11)	8662.5(9)	24.6(3)
O3	2695.5(13)	918.8(10)	956.1(8)	18.8(2)
O4	3925.1(12)	1797.1(10)	1379.7(8)	17.7(2)
O5	6458.3(19)	3246.2(15)	4271.3(12)	42.7(4)
O6	-1586.9(17)	-1592.8(14)	1694.3(13)	41.2(4)
B1	2665(2)	1513.9(16)	1809.0(14)	16.7(4)

Table S3 Anisotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for **3**. The Anisotropic displacement factor exponent takes the form: -
 $2\pi^2[h^2a^{*2}U_{11}+...+2hkaxb^*U_{12}]$

Atom	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
C1	19.2(8)	20.0(9)	18.6(8)	4.7(6)	-8.9(7)	-9.1(7)
C2	19.2(8)	17.8(8)	19.5(8)	3.8(6)	-8.7(7)	-8.5(7)
C3	15.8(8)	17.4(8)	18.2(8)	2.6(6)	-6.7(6)	-7.6(6)
C4	16.2(8)	18.1(8)	13.7(7)	1.0(6)	-4.1(6)	-8.4(6)
C5	15.2(8)	19.0(8)	15.1(8)	1.0(6)	-4.5(6)	-9.7(6)
C6	16.4(8)	19.0(8)	14.4(8)	1.3(6)	-4.3(6)	-8.6(7)
C7	16.7(8)	18.8(8)	17.2(8)	4.6(6)	-6.8(6)	-8.8(7)
C8	16.5(8)	16.5(8)	20.1(8)	3.2(6)	-6.2(6)	-8.0(7)
C9	16.2(8)	16.6(8)	19.9(8)	1.3(6)	-5.6(6)	-8.2(7)
C10	19.3(8)	19.7(9)	19.9(8)	-1.0(7)	-2.8(7)	-6.6(7)
C11	20.0(8)	15.6(8)	24.7(9)	3.1(7)	-8.8(7)	-4.3(7)
C12	26.2(10)	24.8(10)	37.2(11)	2.2(8)	-17.8(9)	-4.8(8)
C13	22.8(9)	20.6(9)	16.8(8)	5.6(7)	-7.1(7)	-7.4(7)
C14	22.5(9)	16.9(8)	20.9(8)	0.8(7)	-6.2(7)	-6.6(7)
C15	23.9(9)	19.0(9)	23.0(9)	6.3(7)	-9.6(7)	-6.4(7)
C16	28.6(10)	33.2(11)	32.8(11)	10.3(9)	-17.4(9)	-10.5(9)
C17	27.5(9)	26.6(10)	17.0(8)	6.4(7)	-7.6(7)	-9.8(8)
C18	16.3(8)	15.7(8)	14.3(8)	2.7(6)	-5.2(6)	-5.5(6)
C19	19.5(8)	23.4(9)	17.6(8)	0.6(7)	-6.2(7)	-11.1(7)
C20	19.8(8)	24.4(9)	17.7(8)	1.5(7)	-3.2(7)	-13.6(7)
C21	18.0(8)	16.7(8)	13.9(8)	2.6(6)	-5.3(6)	-6.0(6)
C22	24.1(9)	25.4(9)	18.7(8)	-0.5(7)	-7.2(7)	-12.9(7)
C23	19.2(8)	26.4(9)	18.4(8)	1.7(7)	-3.9(7)	-14.0(7)
C24	22.7(8)	17.8(8)	15.4(8)	3.2(6)	-5.7(7)	-6.1(7)
C25	29.8(10)	30.2(10)	16.2(9)	-2.4(7)	3.6(7)	-14.4(8)
C26	16.9(8)	22.1(9)	13.0(7)	1.8(6)	-1.6(6)	-10.2(7)
C27	22.1(9)	21.4(9)	23.4(9)	5.0(7)	-9.7(7)	-7.7(7)
C28	26.6(9)	19.0(9)	24.6(9)	0.4(7)	-9.6(7)	-8.0(7)
C29	23.8(9)	28.7(10)	18.5(8)	4.4(7)	-7.1(7)	-15.4(8)
C30	25.1(9)	25.4(10)	26.9(9)	8.1(7)	-14.5(8)	-9.1(8)
C31	22.7(9)	18.6(9)	23.4(9)	3.7(7)	-8.6(7)	-7.0(7)
C32	35.5(11)	38.8(11)	21.8(9)	7.9(8)	-10.9(8)	-25.2(9)
C33	17.3(8)	19.6(8)	17.8(8)	5.3(6)	-7.2(7)	-8.3(7)
C34	22.4(9)	29(1)	16.1(8)	-0.4(7)	-3.1(7)	-11.3(8)
C35	20.3(9)	33.8(11)	20.7(9)	6.4(7)	-5.3(7)	-14.2(8)
C36	22.7(9)	23.6(9)	27.9(9)	8.7(7)	-13.4(8)	-11.4(7)
C37	26.1(9)	22.0(9)	26.4(9)	-1.7(7)	-9.3(8)	-9.2(8)
C38	21.0(8)	23.8(9)	19.2(8)	0.1(7)	-4.7(7)	-9.3(7)
C39	32.1(10)	32.1(11)	40.9(11)	11.9(9)	-21.0(9)	-18.0(9)
N1	17.6(7)	17.3(7)	13.9(6)	1.7(5)	-5.0(5)	-7.4(6)
N2	14.8(6)	15.7(7)	15.4(7)	1.1(5)	-2.9(5)	-6.1(5)
O1	31.8(7)	29.4(7)	17.5(6)	-1.9(5)	-5.8(5)	-14.5(6)
O2	25.9(7)	30.6(7)	13.6(6)	-1.0(5)	0.7(5)	-14.5(6)
O3	19.7(6)	21.1(6)	14.2(5)	0.4(5)	-2.6(5)	-10.3(5)
O4	18.2(6)	21.0(6)	13.1(5)	1.1(5)	-2.5(5)	-10.1(5)
O5	62.0(11)	56.5(11)	43.3(9)	26.3(8)	-38.4(8)	-42.9(9)
O6	35.9(8)	49.7(10)	52.2(10)	18.7(8)	-20.0(7)	-29.8(8)
B1	15.8(8)	16.3(9)	14.4(8)	1.9(7)	-3.2(7)	-5.3(7)

Table S4 Bond Lengths for **3**.

Atom	Atom	Length/Å	Atom	Atom	Length/Å
C1	C2	1.411(2)	C22	C23	1.383(2)
C1	C17	1.494(2)	C24	O1	1.210(2)
C1	N1	1.350(2)	C24	O2	1.336(2)
C2	C3	1.393(2)	C25	O2	1.447(2)
C2	C15	1.506(2)	C26	C27	1.393(2)
C3	C4	1.425(2)	C26	C31	1.402(2)
C3	C14	1.499(2)	C26	O4	1.366(2)
C4	C5	1.401(2)	C27	C28	1.386(2)
C4	N1	1.402(2)	C28	C29	1.392(3)
C5	C6	1.396(2)	C29	C30	1.391(3)
C5	C18	1.497(2)	C29	C32	1.471(2)
C6	C7	1.428(2)	C30	C31	1.382(3)
C6	N2	1.401(2)	C32	O5	1.214(2)
C7	C8	1.391(2)	C33	C34	1.404(2)
C7	C13	1.502(2)	C33	C38	1.390(2)
C8	C9	1.414(2)	C33	O3	1.354(2)
C8	C11	1.499(2)	C34	C35	1.380(2)
C9	C10	1.495(2)	C35	C36	1.392(3)
C9	N2	1.350(2)	C36	C37	1.394(3)
C11	C12	1.531(2)	C36	C39	1.468(3)
C15	C16	1.527(3)	C37	C38	1.386(2)
C18	C19	1.392(2)	C39	O6	1.216(2)
C18	C23	1.393(2)	N1	B1	1.555(2)
C19	C20	1.386(2)	N2	B1	1.551(2)
C20	C21	1.391(2)	O3	B1	1.448(2)
C21	C22	1.395(2)	O4	B1	1.465(2)
C21	C24	1.497(2)			

Table S5 Bond Angles for **3**.

Atom	Atom	Atom	Angle/°	Atom	Atom	Atom	Angle/°
C2	C1	C17	126.61(15)	O1	C24	O2	124.44(16)
N1	C1	C2	109.76(14)	O2	C24	C21	111.50(14)
N1	C1	C17	123.55(15)	C27	C26	C31	119.90(16)
C1	C2	C15	123.92(15)	O4	C26	C27	120.71(15)
C3	C2	C1	107.46(15)	O4	C26	C31	119.31(15)
C3	C2	C15	128.59(16)	C28	C27	C26	119.69(16)
C2	C3	C4	106.78(14)	C27	C28	C29	120.63(17)
C2	C3	C14	125.70(15)	C28	C29	C32	119.78(17)
C4	C3	C14	127.52(15)	C30	C29	C28	119.42(16)
C5	C4	C3	132.27(15)	C30	C29	C32	120.80(17)
C5	C4	N1	119.78(15)	C31	C30	C29	120.58(17)
N1	C4	C3	107.94(14)	C30	C31	C26	119.78(17)
C4	C5	C18	119.93(14)	O5	C32	C29	124.5(2)
C6	C5	C4	121.76(15)	C38	C33	C34	119.37(16)
C6	C5	C18	118.30(14)	O3	C33	C34	124.69(16)
C5	C6	C7	131.98(15)	O3	C33	C38	115.94(14)
C5	C6	N2	120.23(14)	C35	C34	C33	119.46(17)
N2	C6	C7	107.79(14)	C34	C35	C36	121.44(16)
C6	C7	C13	128.53(15)	C35	C36	C37	118.85(16)
C8	C7	C6	106.83(14)	C35	C36	C39	121.41(17)
C8	C7	C13	124.64(15)	C37	C36	C39	119.74(18)
C7	C8	C9	107.47(15)	C38	C37	C36	120.27(17)
C7	C8	C11	127.33(15)	C37	C38	C33	120.59(16)
C9	C8	C11	125.13(15)	O6	C39	C36	125.3(2)
C8	C9	C10	126.62(15)	C1	N1	C4	108.05(14)
N2	C9	C8	109.60(14)	C1	N1	B1	126.11(14)
N2	C9	C10	123.76(15)	C4	N1	B1	125.52(13)
C8	C11	C12	112.12(14)	C6	N2	B1	125.45(14)
C2	C15	C16	112.89(15)	C9	N2	C6	108.29(13)
C19	C18	C5	120.19(14)	C9	N2	B1	125.85(14)
C19	C18	C23	119.38(15)	C24	O2	C25	117.02(14)
C23	C18	C5	120.40(14)	C33	O3	B1	124.62(13)
C20	C19	C18	120.21(15)	C26	O4	B1	118.69(12)
C19	C20	C21	120.34(15)	N2	B1	N1	106.39(13)
C20	C21	C22	119.47(15)	O3	B1	N1	112.95(14)
C20	C21	C24	121.78(15)	O3	B1	N2	112.34(14)
C22	C21	C24	118.70(15)	O3	B1	O4	104.07(13)
C23	C22	C21	120.07(16)	O4	B1	N1	110.57(13)
C22	C23	C18	120.52(15)	O4	B1	N2	110.60(13)
O1	C24	C21	124.05(16)				

Table S6 Torsion Angles for **3**.

A	B	C	D	Angle/°	A	B	C	D	Angle/°
C1	C2	C3	C4	-0.39(18)	C17	C1	C2	C15	5.9(3)
C1	C2	C3	C14	179.22(15)	C17	C1	N1	C4	176.04(15)
C1	C2	C15	C16	82.2(2)	C17	C1	N1	B1	2.3(3)
C1	N1	B1	N2	-176.71(14)	C18	C5	C6	C7	0.2(3)
C1	N1	B1	O3	-53.0(2)	C18	C5	C6	N2	-178.97(14)
C1	N1	B1	O4	63.2(2)	C18	C19	C20	C21	0.8(3)
C2	C1	N1	C4	-0.86(18)	C19	C18	C23	C22	0.0(3)
C2	C1	N1	B1	-174.63(14)	C19	C20	C21	C22	-0.3(3)
C2	C3	C4	C5	-178.50(17)	C19	C20	C21	C24	177.10(16)
C2	C3	C4	N1	-0.12(18)	C20	C21	C22	C23	-0.3(3)
C3	C2	C15	C16	-95.5(2)	C20	C21	C24	O1	-176.47(17)
C3	C4	C5	C6	178.78(17)	C20	C21	C24	O2	2.7(2)
C3	C4	C5	C18	-2.0(3)	C21	C22	C23	C18	0.4(3)
C3	C4	N1	C1	0.61(18)	C21	C24	O2	C25	-178.78(14)
C3	C4	N1	B1	174.42(14)	C22	C21	C24	O1	0.9(3)
C4	C5	C6	C7	179.38(16)	C22	C21	C24	O2	-179.93(15)
C4	C5	C6	N2	0.2(2)	C23	C18	C19	C20	-0.6(3)
C4	C5	C18	C19	90.7(2)	C24	C21	C22	C23	-177.78(16)
C4	C5	C18	C23	-91.2(2)	C26	C27	C28	C29	-0.1(3)
C4	N1	B1	N2	10.6(2)	C26	O4	B1	N1	63.96(18)
C4	N1	B1	O3	134.27(15)	C26	O4	B1	N2	-53.62(19)
C4	N1	B1	O4	-109.57(16)	C26	O4	B1	O3	-174.48(13)
C5	C4	N1	C1	179.23(14)	C27	C26	C31	C30	0.0(3)
C5	C4	N1	B1	-7.0(2)	C27	C26	O4	B1	-86.23(19)
C5	C6	C7	C8	-177.95(17)	C27	C28	C29	C30	0.1(3)
C5	C6	C7	C13	2.7(3)	C27	C28	C29	C32	-179.70(16)
C5	C6	N2	C9	178.37(14)	C28	C29	C30	C31	0.0(3)
C5	C6	N2	B1	5.3(2)	C28	C29	C32	O5	176.92(18)
C5	C18	C19	C20	177.48(16)	C29	C30	C31	C26	0.0(3)
C5	C18	C23	C22	-178.07(16)	C30	C29	C32	O5	-2.9(3)
C6	C5	C18	C19	-90.09(19)	C31	C26	C27	C28	0.1(3)
C6	C5	C18	C23	88.0(2)	C31	C26	O4	B1	97.08(18)
C6	C7	C8	C9	-1.09(18)	C32	C29	C30	C31	179.74(17)
C6	C7	C8	C11	175.94(16)	C33	C34	C35	C36	-0.5(3)
C6	N2	B1	N1	-9.7(2)	C33	O3	B1	N1	-71.55(19)
C6	N2	B1	O3	-133.81(15)	C33	O3	B1	N2	48.8(2)
C6	N2	B1	O4	110.38(17)	C33	O3	B1	O4	168.49(13)
C7	C6	N2	C9	-0.97(18)	C34	C33	C38	C37	0.4(3)
C7	C6	N2	B1	-174.01(14)	C34	C33	O3	B1	19.4(3)
C7	C8	C9	C10	-177.91(15)	C34	C35	C36	C37	-0.1(3)
C7	C8	C9	N2	0.52(19)	C34	C35	C36	C39	-179.32(17)
C7	C8	C11	C12	-79.2(2)	C35	C36	C37	C38	0.8(3)
C8	C9	N2	C6	0.29(18)	C35	C36	C39	O6	-0.3(3)
C8	C9	N2	B1	173.30(14)	C36	C37	C38	C33	-1.0(3)
C9	C8	C11	C12	97.4(2)	C37	C36	C39	O6	-179.54(19)
C9	N2	B1	N1	178.42(14)	C38	C33	C34	C35	0.3(3)
C9	N2	B1	O3	54.3(2)	C38	C33	O3	B1	-161.22(15)
C9	N2	B1	O4	-61.5(2)	C39	C36	C37	C38	-179.90(17)
C10	C9	N2	C6	178.77(15)	N1	C1	C2	C3	0.79(19)
C10	C9	N2	B1	-8.2(2)	N1	C1	C2	C15	-177.33(15)
C11	C8	C9	C10	5.0(3)	N1	C4	C5	C6	0.6(2)
C11	C8	C9	N2	-176.60(15)	N1	C4	C5	C18	179.74(14)
C13	C7	C8	C9	178.24(15)	N2	C6	C7	C8	1.27(18)
C13	C7	C8	C11	-4.7(3)	N2	C6	C7	C13	-178.03(15)

C14	C3	C4	C5	1.9(3)	O1	C24	O2	C25	0.3(3)
C14	C3	C4	N1	-179.72(15)	O3	C33	C34	C35	179.71(16)
C15	C2	C3	C4	177.61(16)	O3	C33	C38	C37	-179.00(16)
C15	C2	C3	C14	-2.8(3)	O4	C26	C27	C28	-176.59(15)
C17	C1	C2	C3	-175.99(16)	O4	C26	C31	C30	176.68(15)

Table S7 Hydrogen Atom Coordinates ($\text{\AA} \times 10^4$) and Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for **3**.

Atom	x	y	z	U(eq)
H10A	4773	-1601	1456	32
H10B	5960	-1322	1678	32
H10C	5003	-462	1084	32
H11A	5282	-2362	3200	25
H11B	4188	-2130	4362	25
H12A	6469	-1353	3593	44
H12B	6472	-2359	4326	44
H12C	5337	-1046	4745	44
H13A	2496	-656	5573	31
H13B	904	256	5651	31
H13C	2028	702	5768	31
H14A	-2523	5527	4237	32
H14B	-1432	4931	4827	32
H14C	-2471	4365	4753	32
H15A	-866	5762	1554	27
H15B	-2001	6133	2705	27
H16A	-2147	4764	1253	46
H16B	-3199	6106	1606	46
H16C	-3295	5167	2398	46
H17A	2076	2741	331	37
H17B	1756	4074	486	37
H17C	560	3735	346	37
H19	-1622	1916	5197	23
H20	-2934	2373	6944	24
H22	-234	3722	7157	26
H23	1099	3236	5417	25
H25A	-4055	3450	10130	42
H25B	-5070	2916	9957	42
H25C	-5400	4247	9808	42
H27	2885	3961	2029	27
H28	3610	4773	3050	29
H30	6523	1587	3231	30
H31	5815	762	2211	27
H32	5131	4607	4015	34
H34	267	1015	2438	28
H35	-996	-78	2428	30
H37	1907	-1626	-375	30
H38	3214	-567	-361	26
H39	-107	-2166	428	38

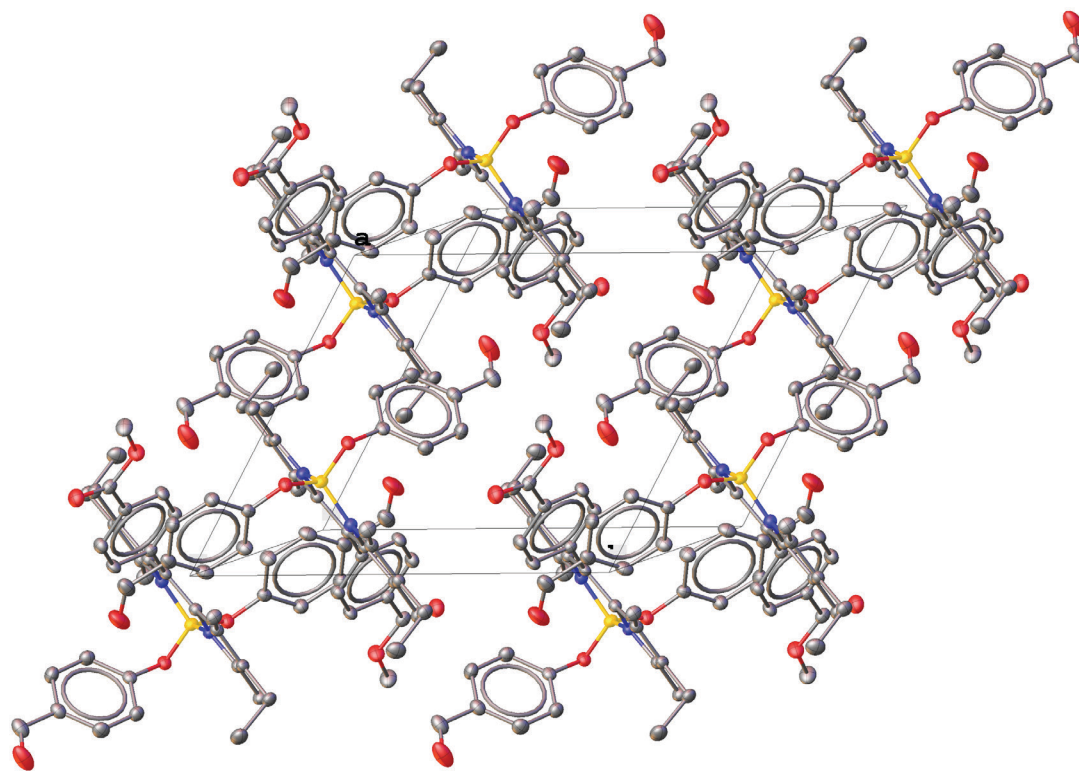


Figure 35: View of crystal packing in **3**.

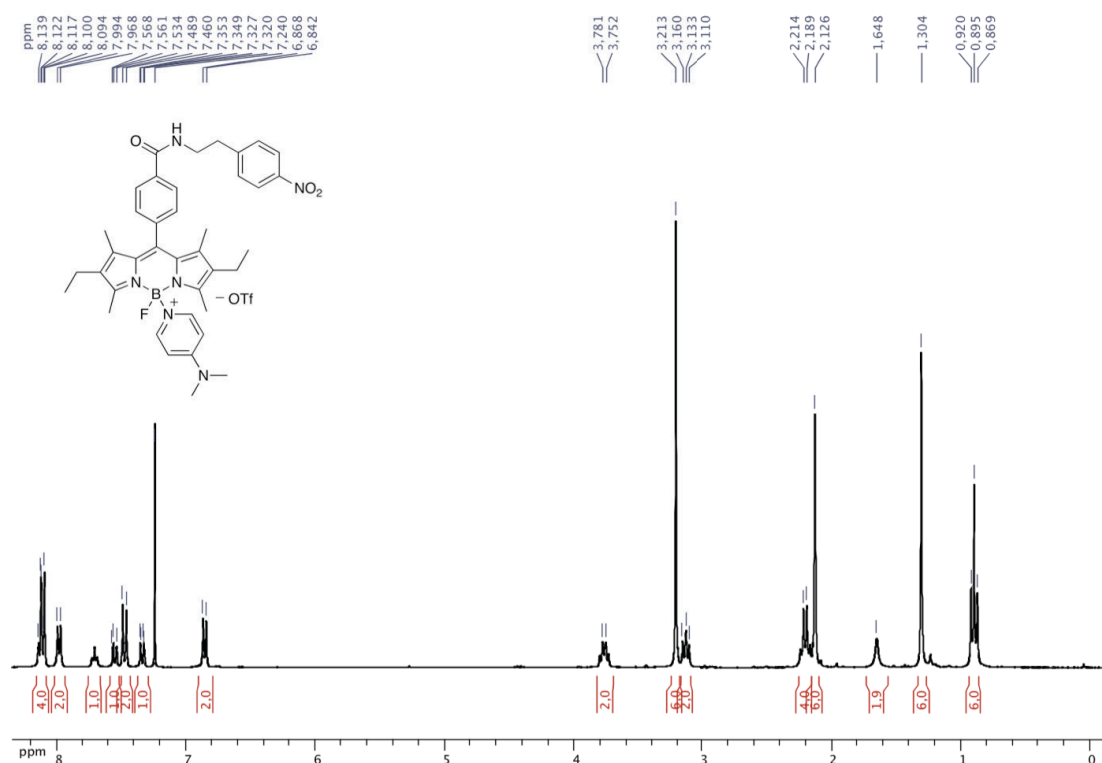
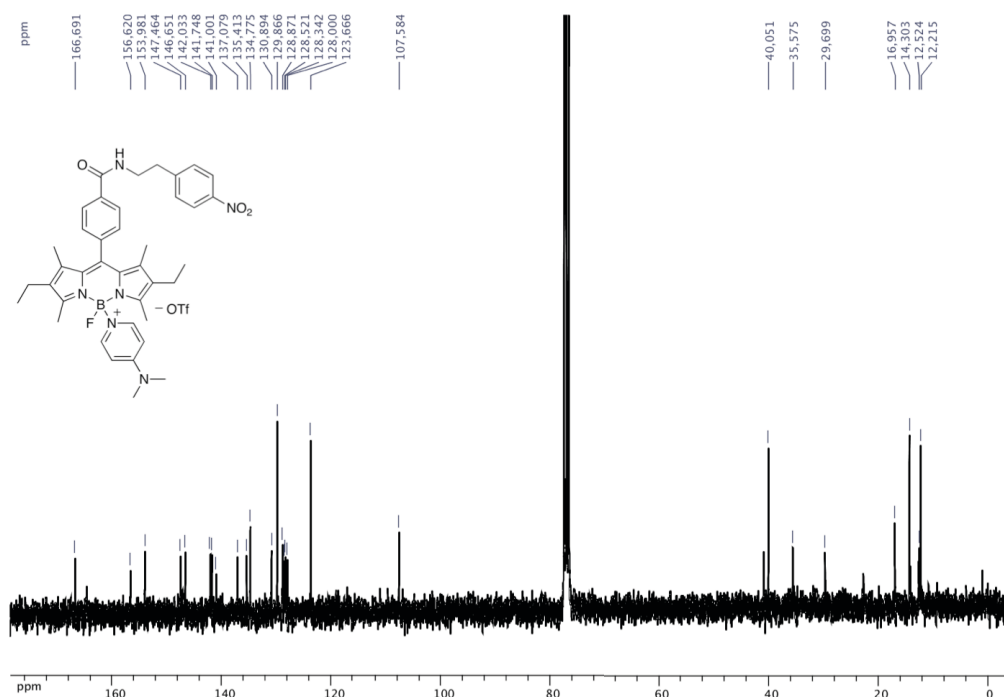
Annexe 3 : “Supporting Information” de l'article II

BODIPY-DMAP alkynes: a convenient tool for labelling biomolecules for bimodal PET-optical imaging

Bertrand Brizet, Victor Goncalves, Claire Bernhard, Yoann Rousselin, Pierre D Harvey, Franck Denat*, Christine Goze*

Figure 1: ^1H NMR spectrum of 3 .	287
Figure 2: ^{13}C NMR spectrum of 3 .	287
Figure 3: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 3 in 2-MeTHF.	288
Figure 4: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 3 .	288
Figure 5: ^1H NMR spectrum of 4 .	289
Figure 6: ^{13}C NMR spectrum of 4 .	290
Figure 7: HRMS (ESI) mass spectra of 4 .	291
Figure 8: ^1H NMR spectrum of 5	292
Figure 9: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 5 .	292
Figure 10: ^1H NMR spectrum of 6	293
Figure 11: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 6	293
Figure 12: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 6 .	294
Figure 13: ^1H NMR spectrum of 8	295
Figure 14: ^{13}C NMR spectrum of 8 .	295
Figure 15: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 8	296
Figure 16: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 8 in 2-MeTHF.	297
Figure 17: ^1H NMR spectrum of 9	297
Figure 18: ^{13}C NMR spectrum of 9 .	298
Figure 19: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 9 .	298
Figure 20: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 9 .	299
Figure 21: ^1H NMR spectrum of 10	300
Figure 22: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 10 .	301
Figure 23: ^1H NMR spectrum of 11 .	302
Figure 24: ^{13}C NMR spectrum of 11	302
Figure 25: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 11 .	303
Figure 26: HPLC traces of 12 .	304
Figure 27: HRMS (ESI) mass spectra of 12 .	305
Figure 28: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 12 in DMSO	305
Figure 29: HPLC traces of compound 13	306
Figure 30: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 13 .	307
Figure 31: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 13 .	308
Figure 32: ^1H NMR spectrum of 15 .	309
Figure 33: ^{13}C NMR spectrum of 15 .	309
Figure 34: HRMS (ESI) mass spectra of 15	310
Figure 35: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 15	311
Figure 36: ^1H NMR spectrum of 16	311
Figure 37: ESI spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 16 .	312

Figure 38: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 16	313
Figure 39: HPLC traces of 17 .	314
Figure 40: HRMS (ESI) mass spectra of 17 .	315
Figure 41: ^1H NMR spectrum of 18 in CDCl_3 .	315
Figure 42: ^1H NMR spectrum of 19	316
Figure 43: ^{13}C NMR spectrum of 19	316
Figure 44: HRMS (ESI) mass spectra of 19	317
Figure 45: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 19	317
Figure 46: ^1H NMR spectrum of 20	318
Figure 47: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 20	319
Figure 48: HRMS (ESI) mass spectra of 20 .	320
Figure 49: HPLC traces of 21	321
Figure 50: HRMS (ESI) mass spectra of 21 .	322
Figure 51: Absorption, fluorescence and excitation spectra of 20 .	322
Figure 52: HPLC trace of the peptide BBN	323
Figure 53: OLEX2 view of hydrogen bonding in 8 .	323

Figure 1: ¹H NMR spectrum of **3** (CDCl₃, 300 MHz, 298 K).Figure 2: ¹³C NMR spectrum of **3** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K).

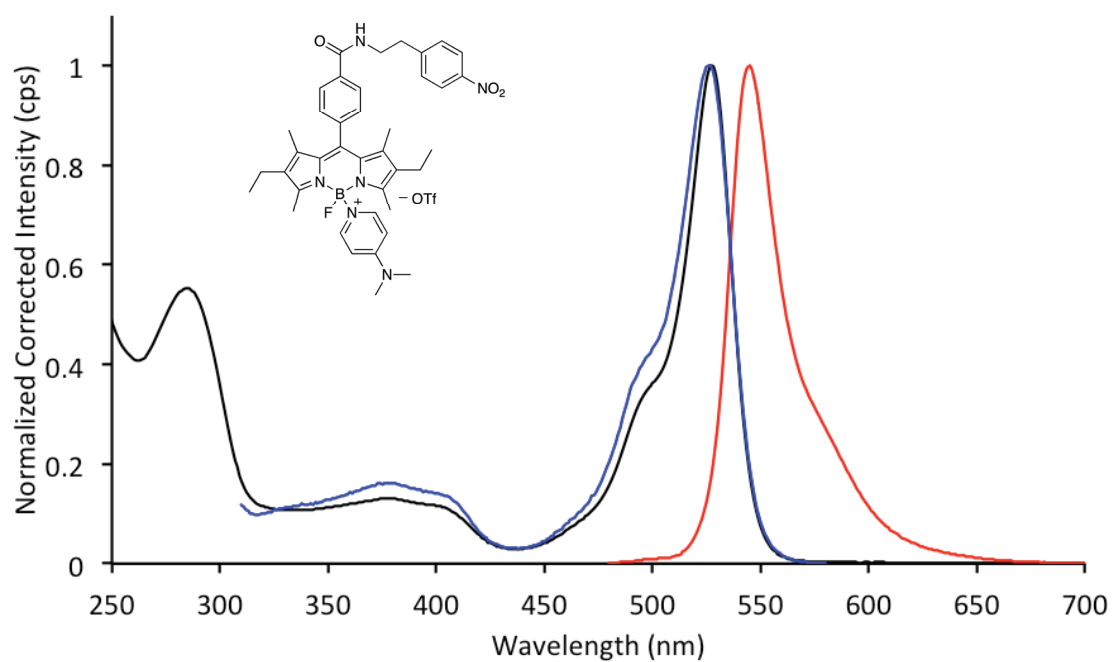
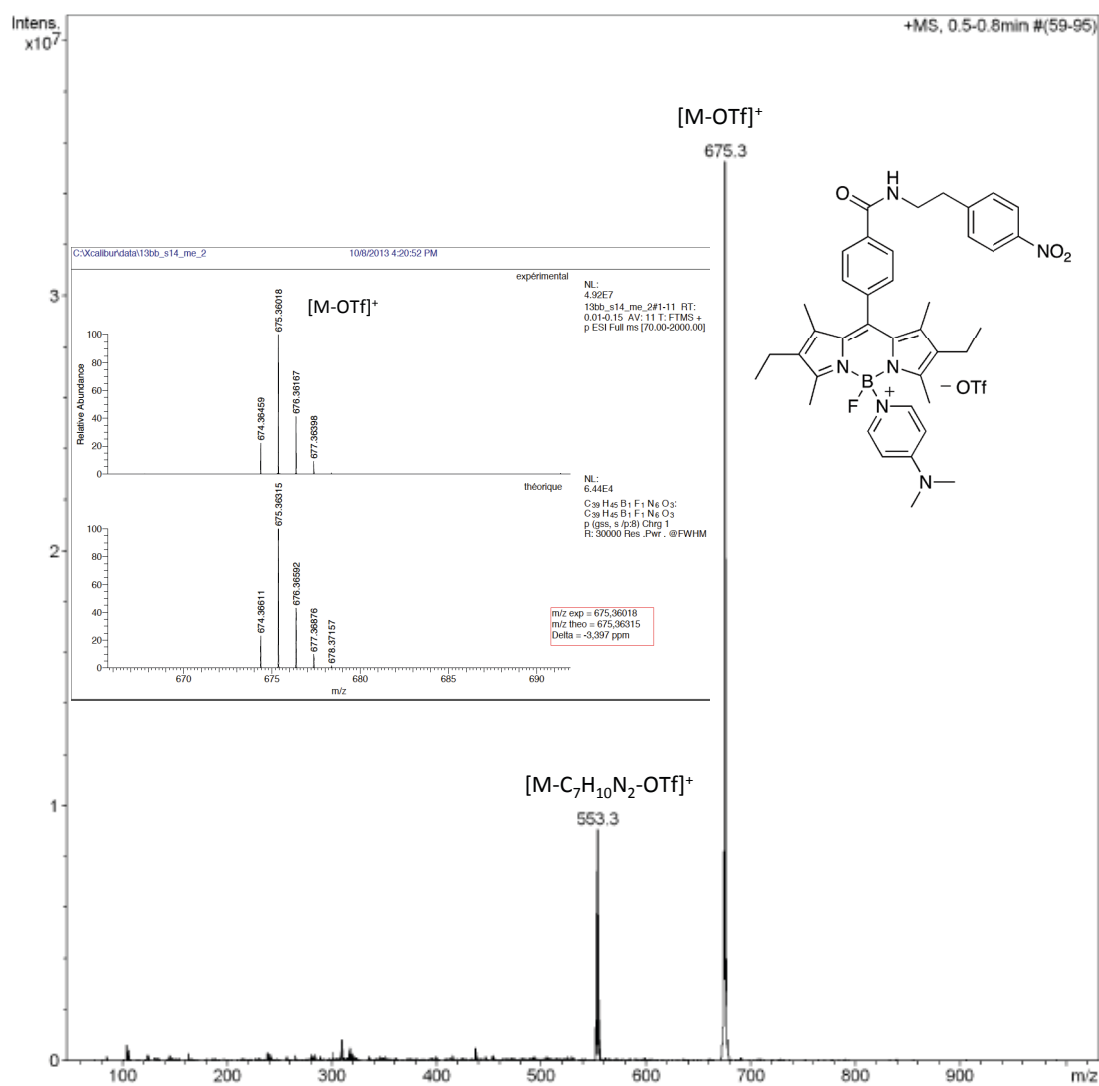
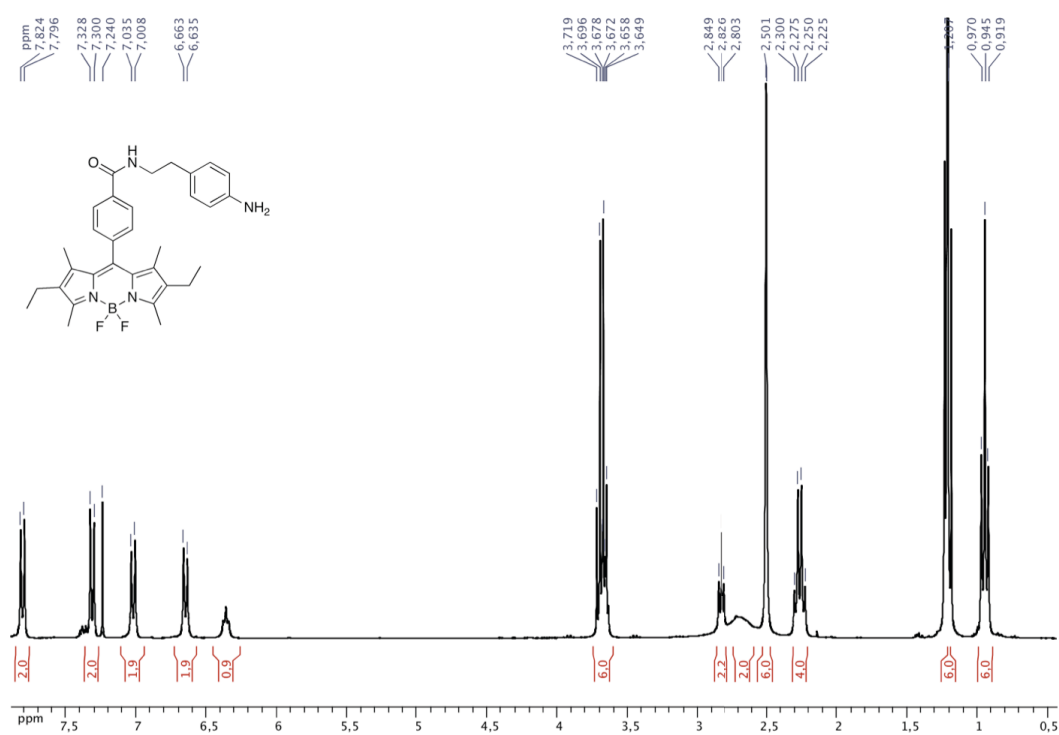
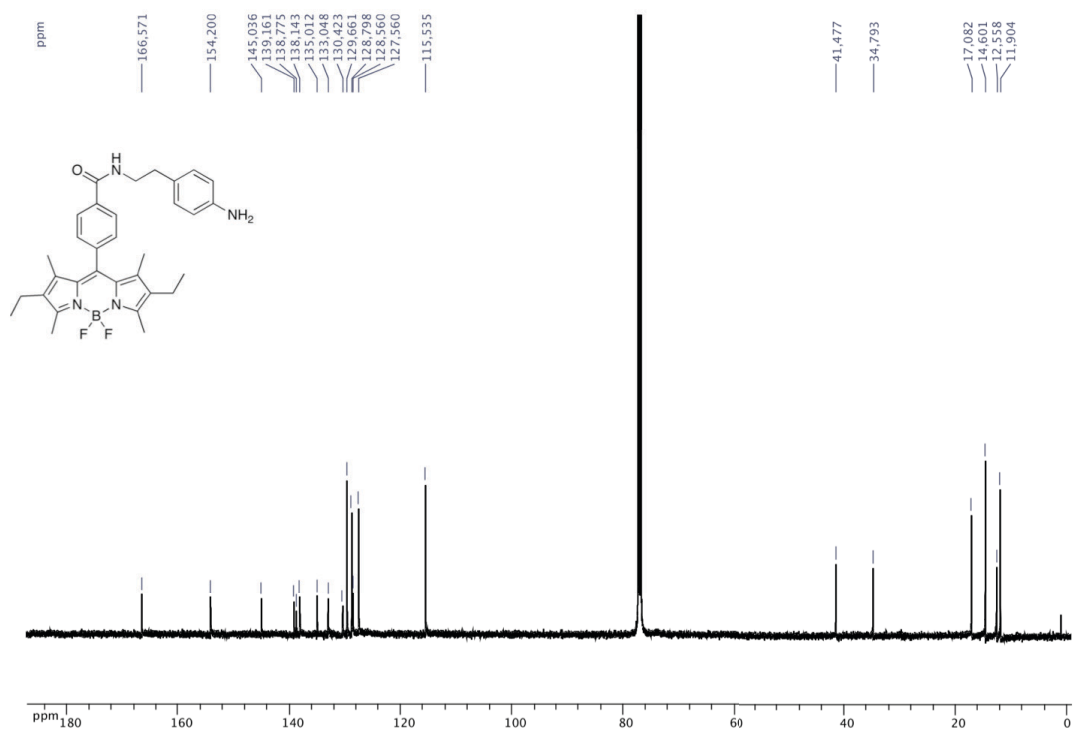


Figure 3: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{ex}=470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{em}=590$ nm) spectra of **3** in 2-MeTHF at room temperature.

Figure 4: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **3**.

Figure 5: ¹H NMR spectrum of **4** (CDCl₃, 300 MHz, 298 K).Figure 6: ¹³C NMR spectrum of **4** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K).

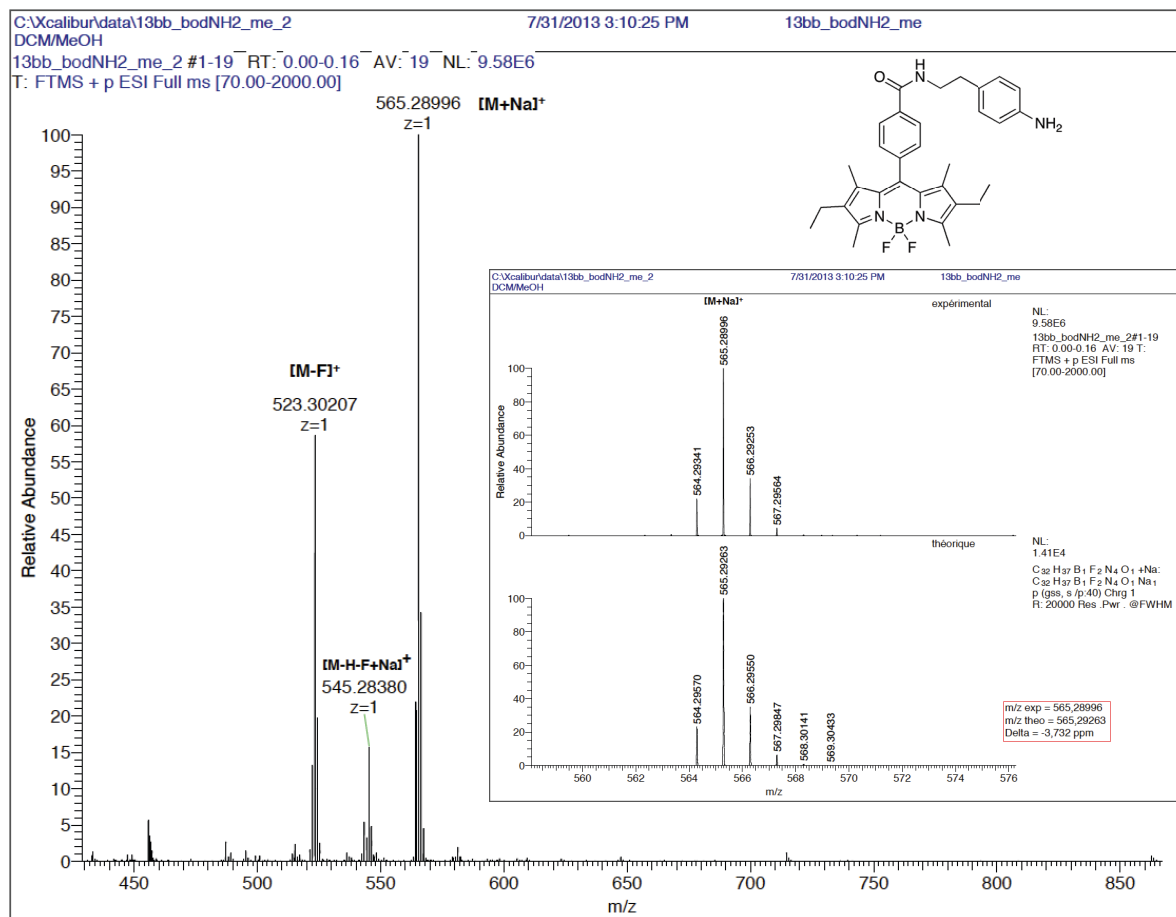
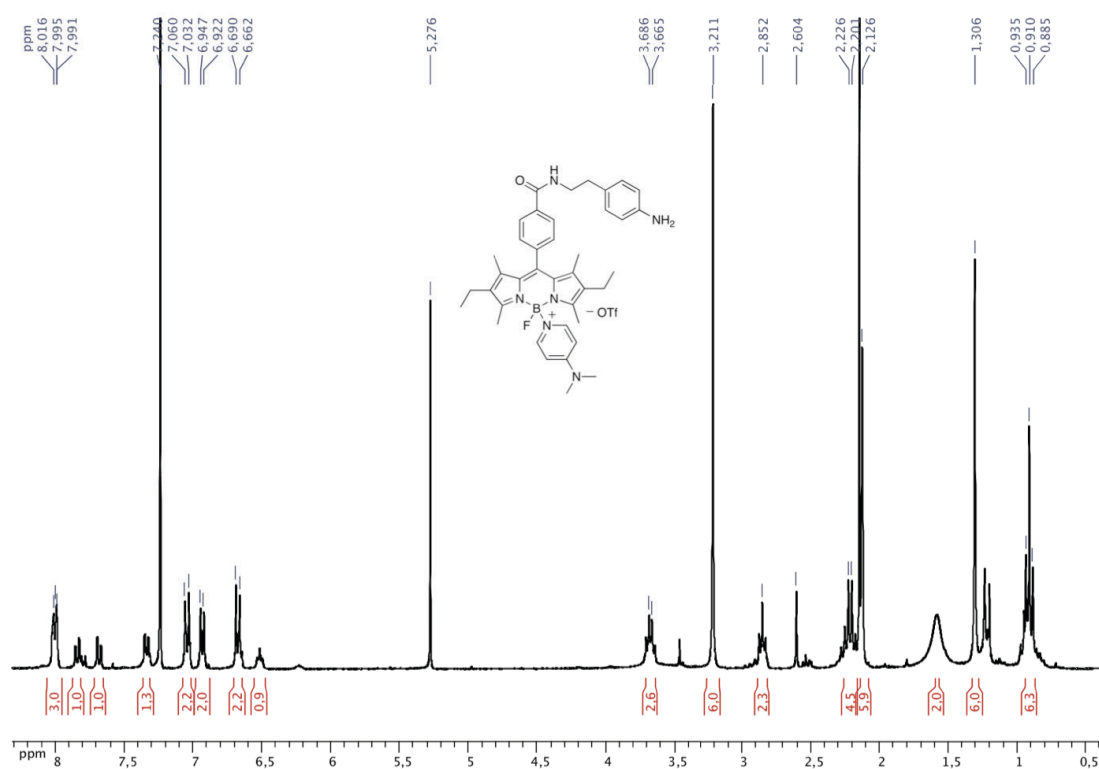
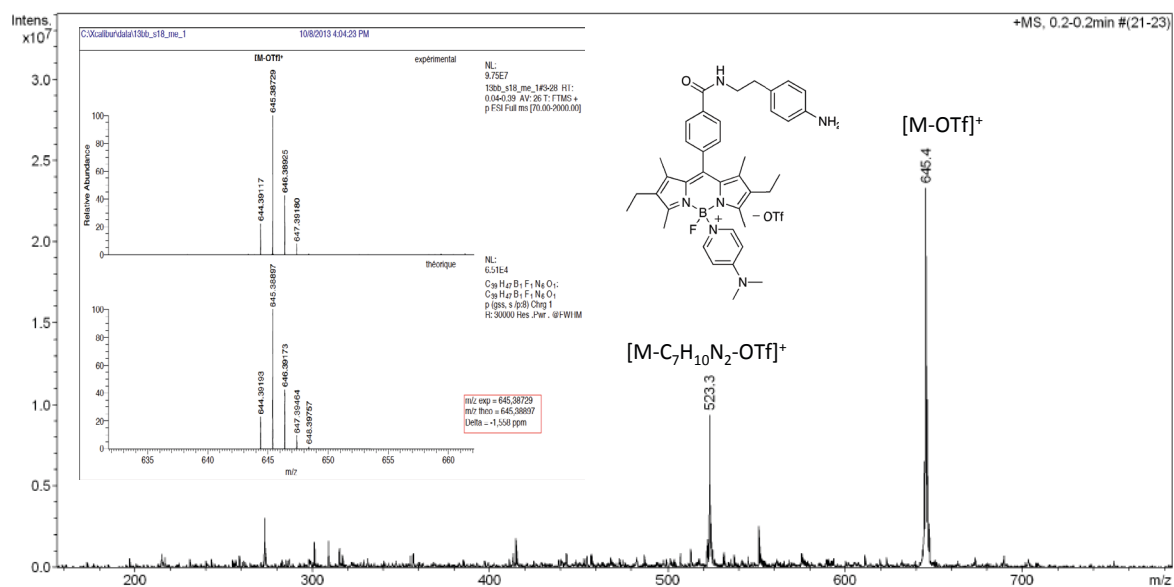
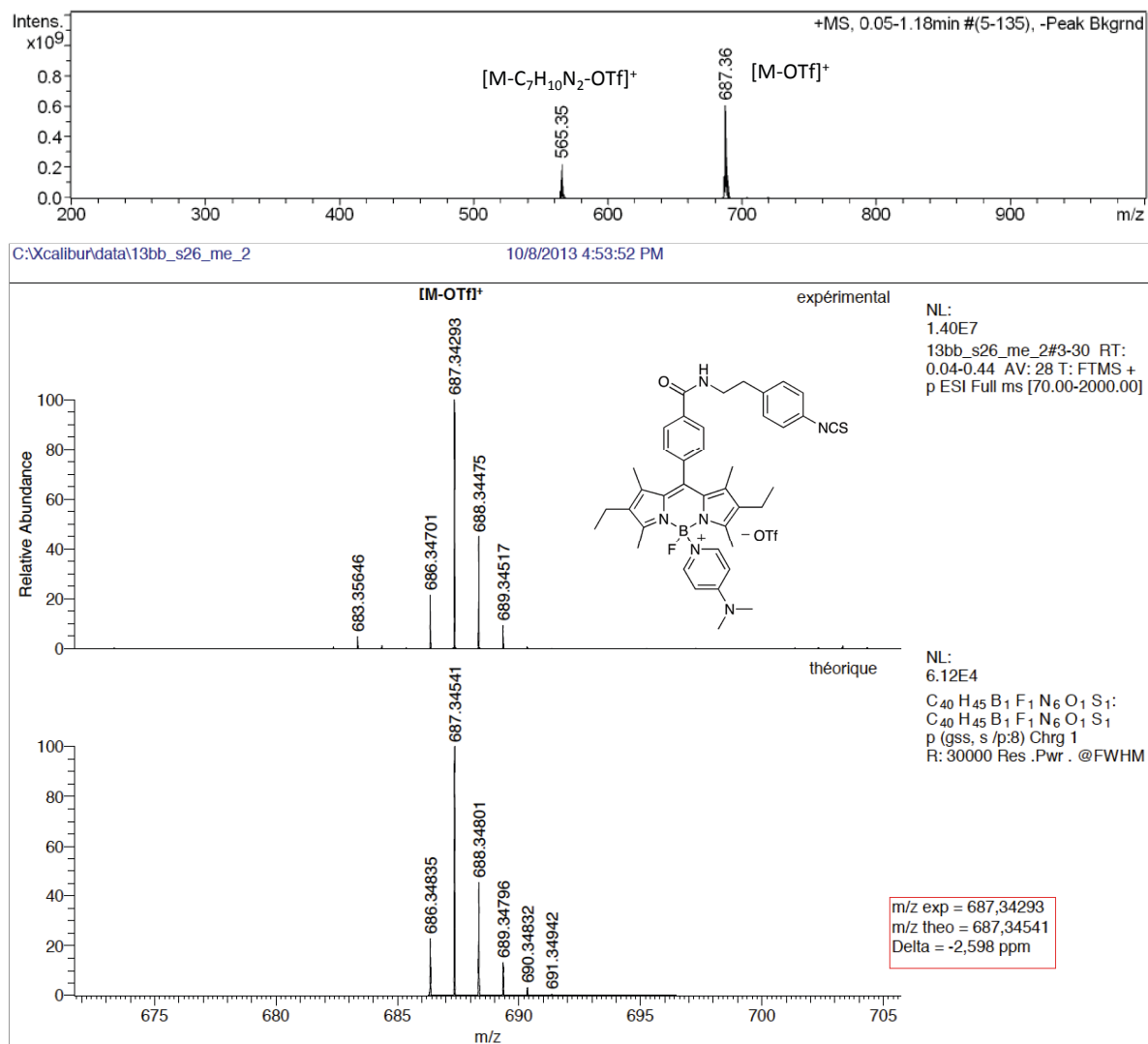
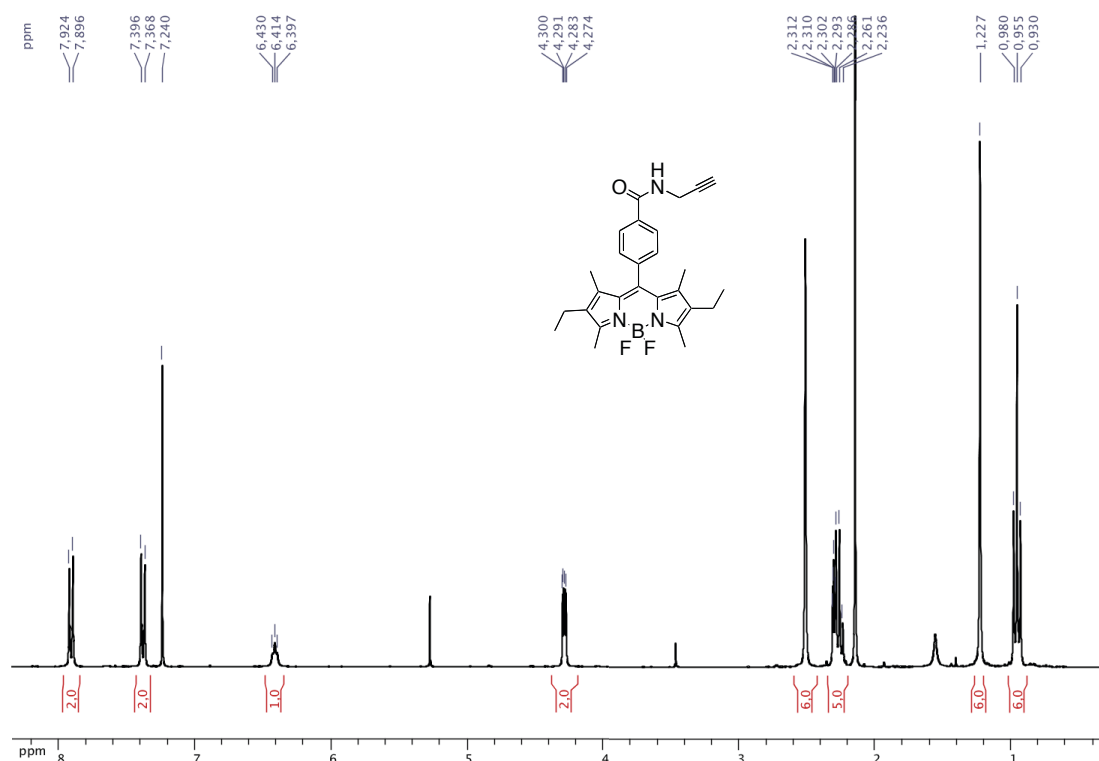
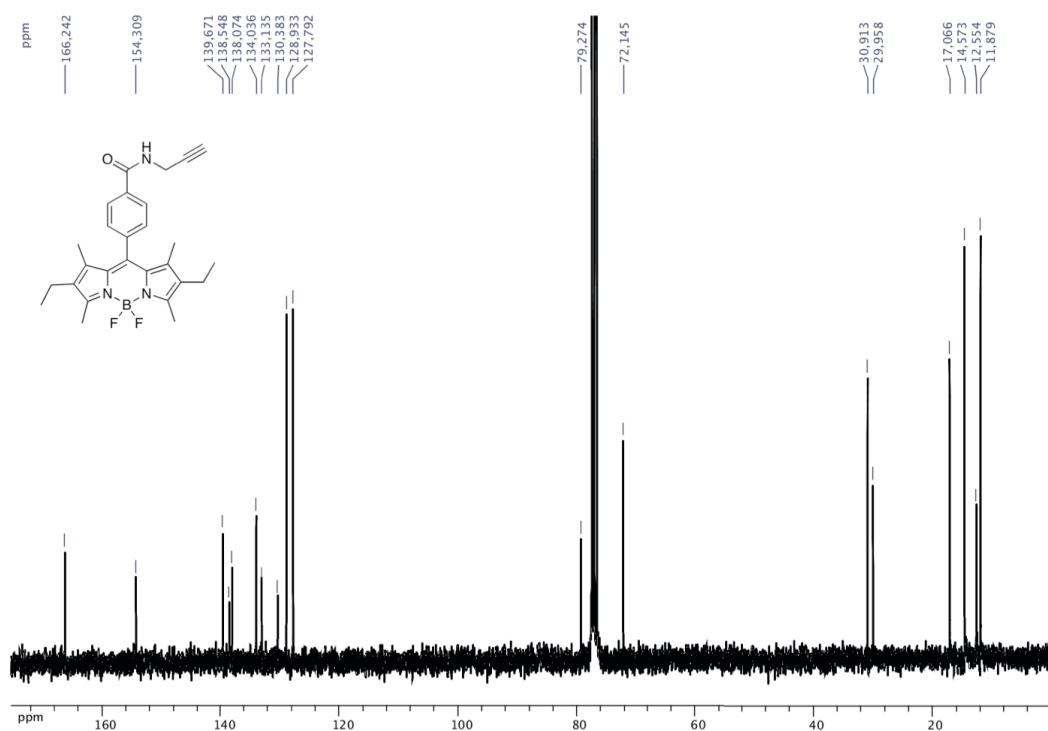


Figure 7: HRMS (ESI) mass spectra of 4.

Figure 8: ^1H NMR spectrum of **5** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K)Figure 9: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **5**.

Figure 12: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **6**.

Figure 13: ¹H NMR spectrum of **8** (CDCl₃, 300 MHz, 298 K)Figure 14: ¹³C NMR spectrum of **8** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K).

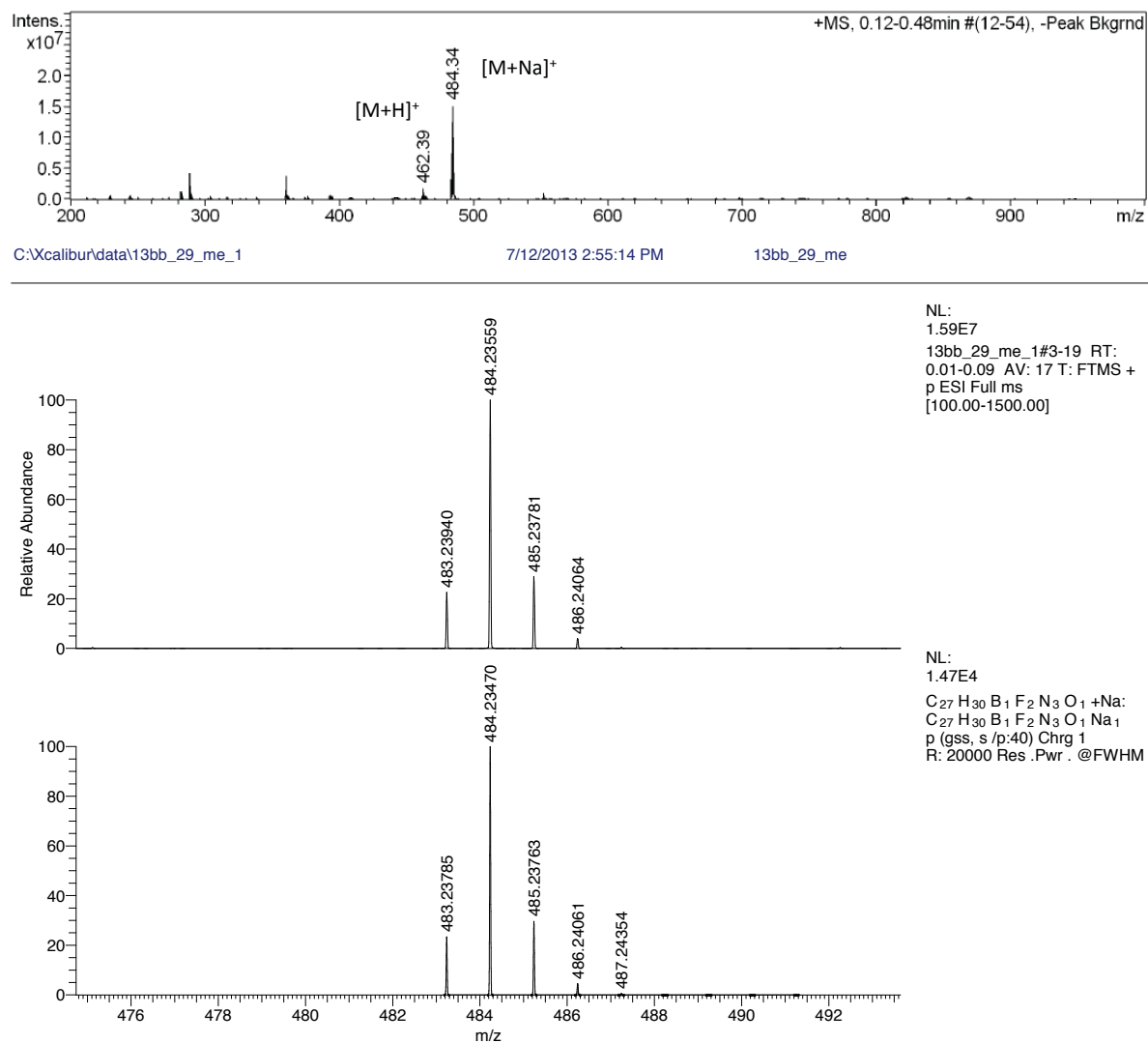


Figure 15: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **8** (up = experimental, down = theoretical)

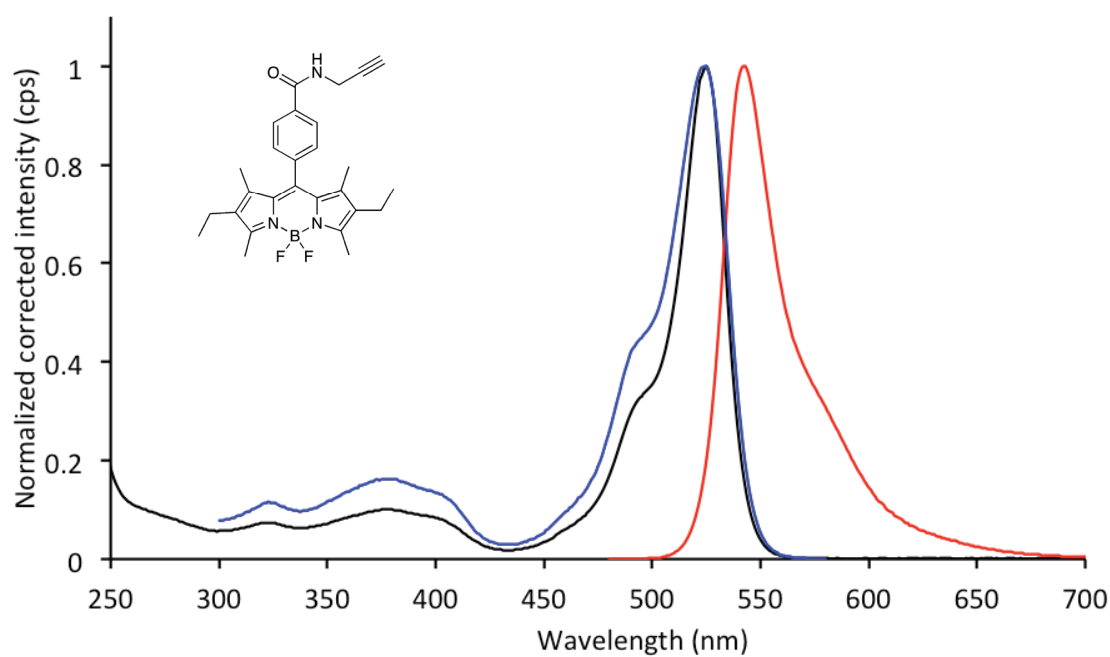


Figure 16: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm) spectra of **8** in 2-MeTHF at room temperature.

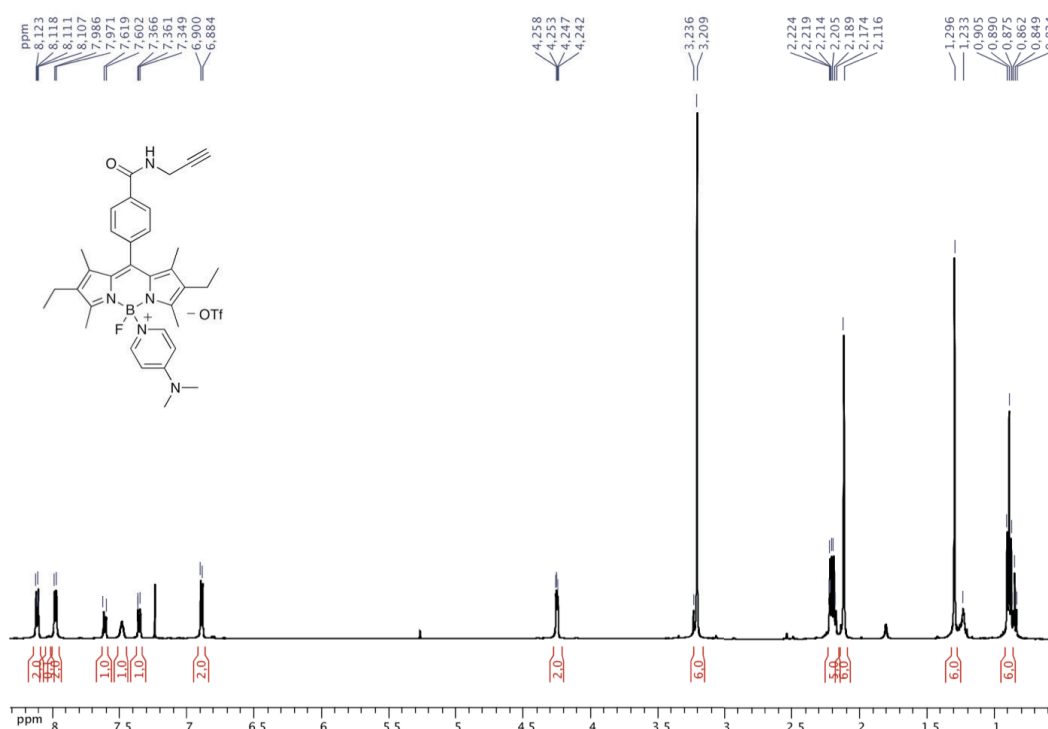
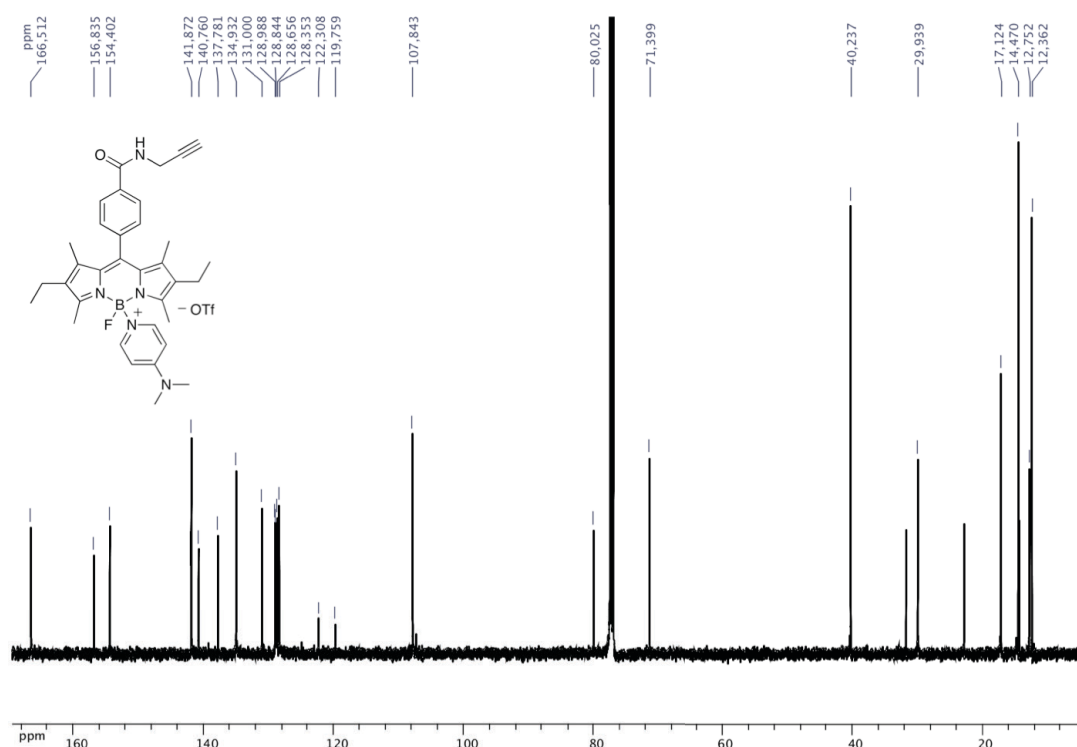
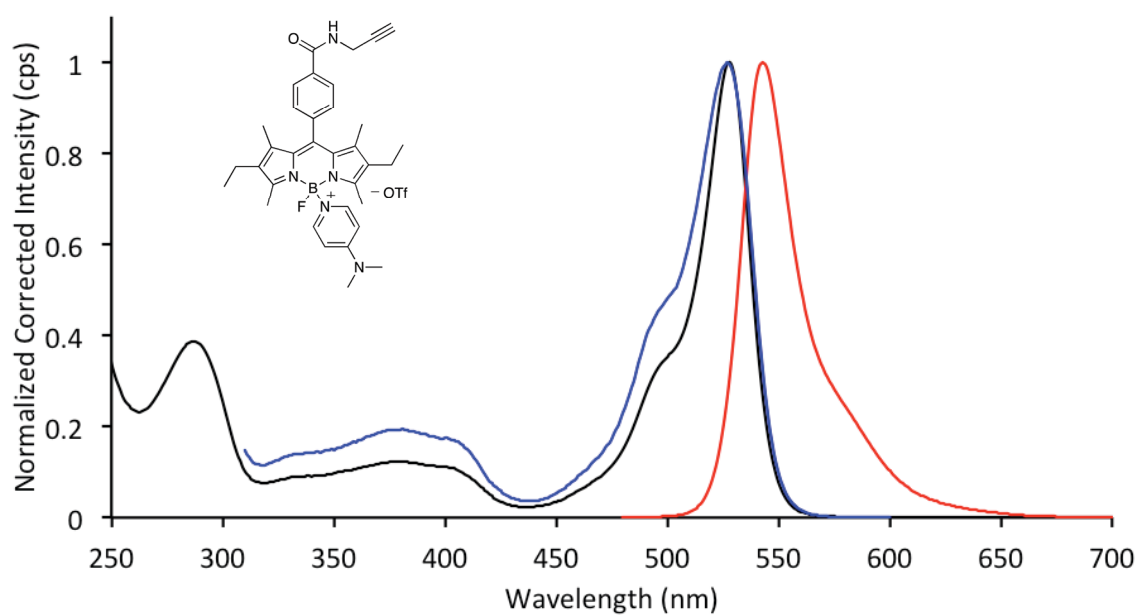
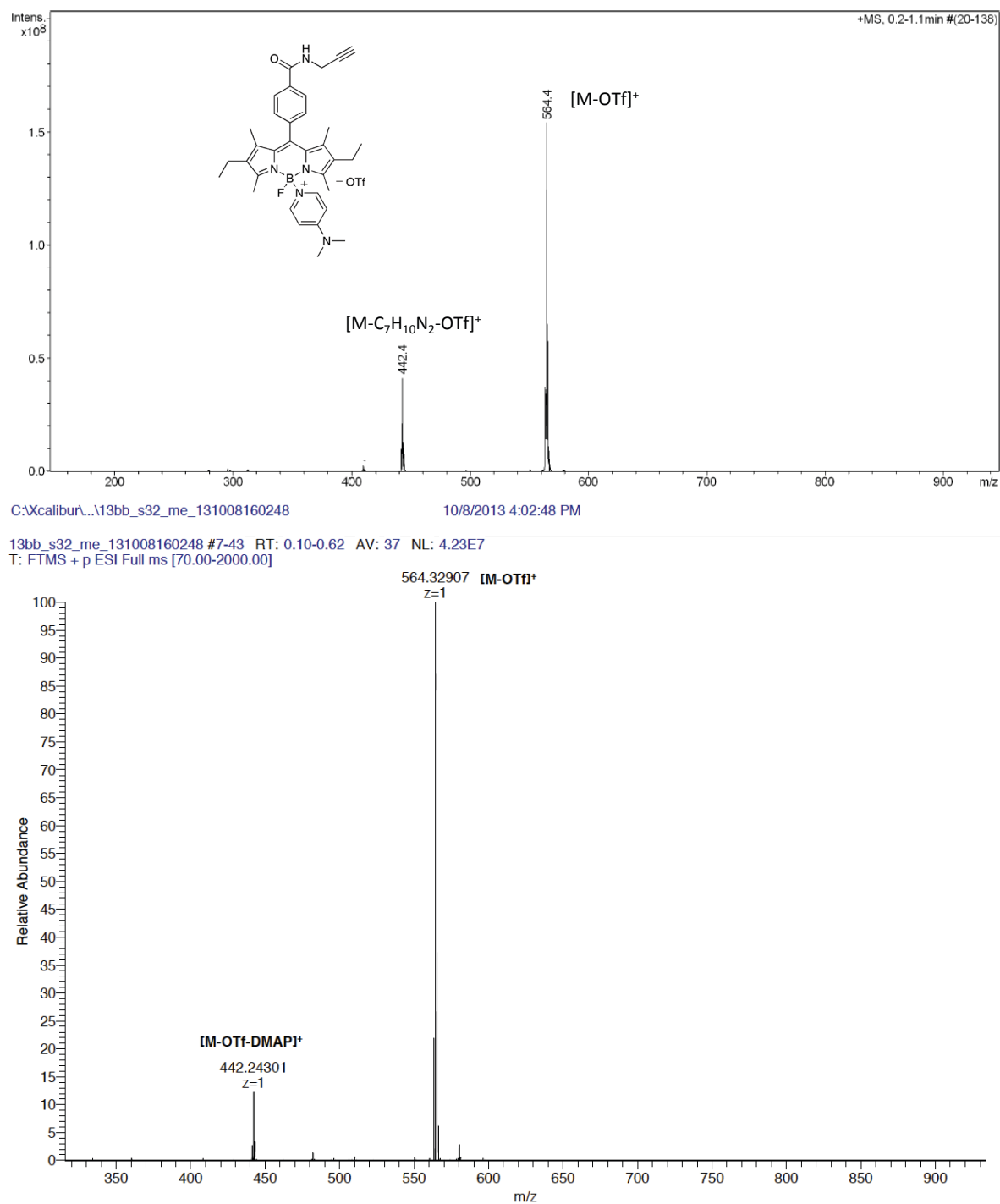


Figure 17: ^1H NMR spectrum of **9** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K)

Figure 18: ¹³C NMR spectrum of **9** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K).Figure 19: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 610$ nm) spectra of **9** in 2-MeTHF at room temperature.

Figure 20: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **9**.

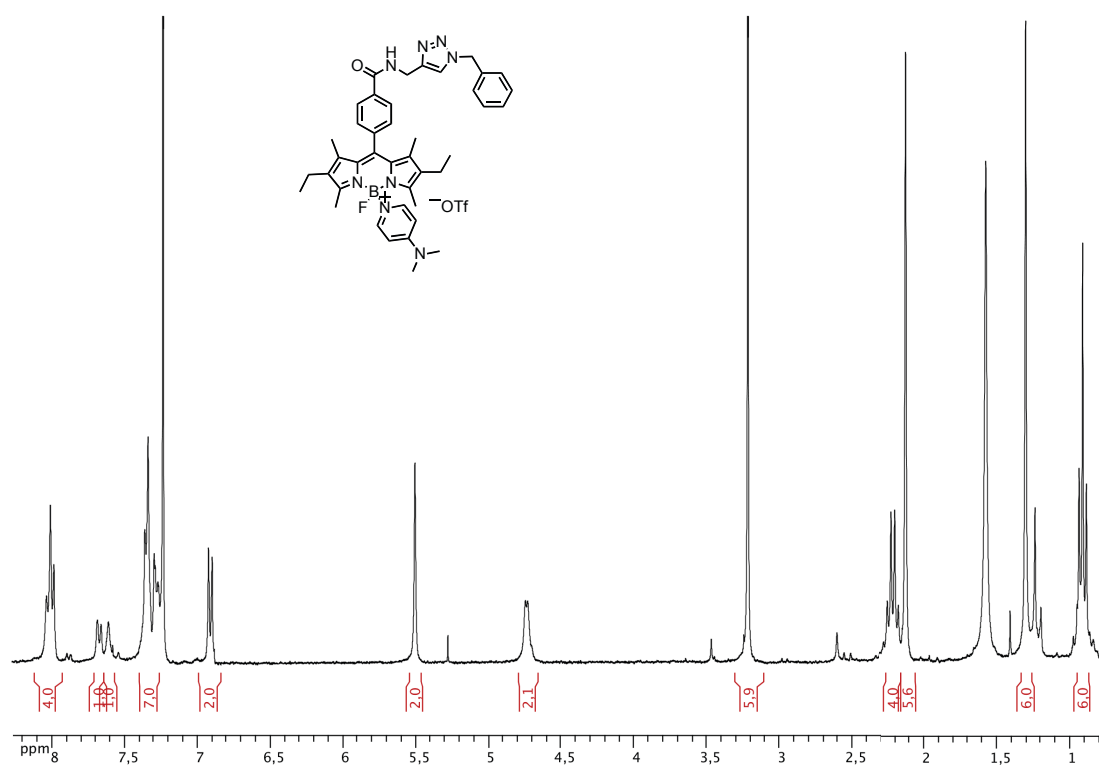
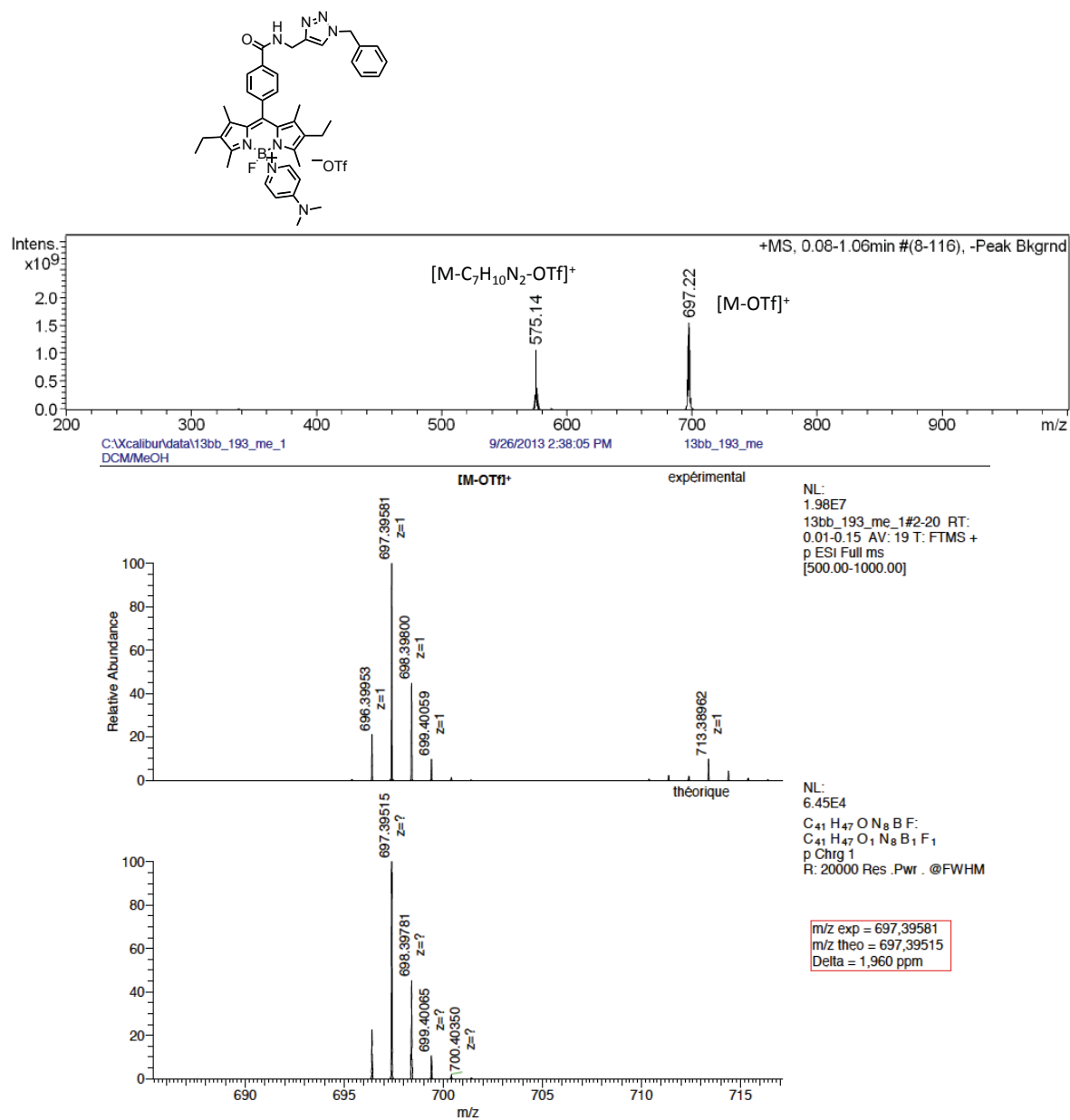
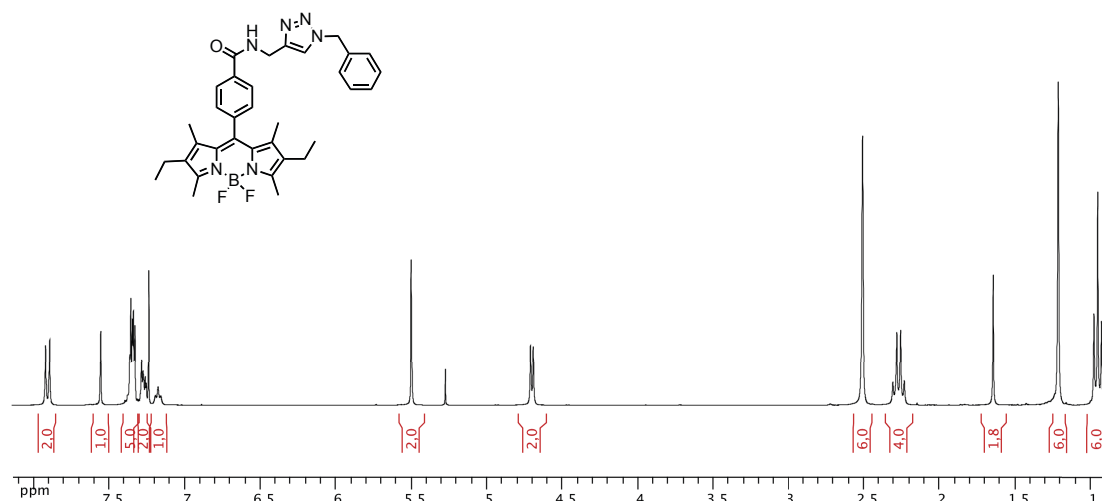
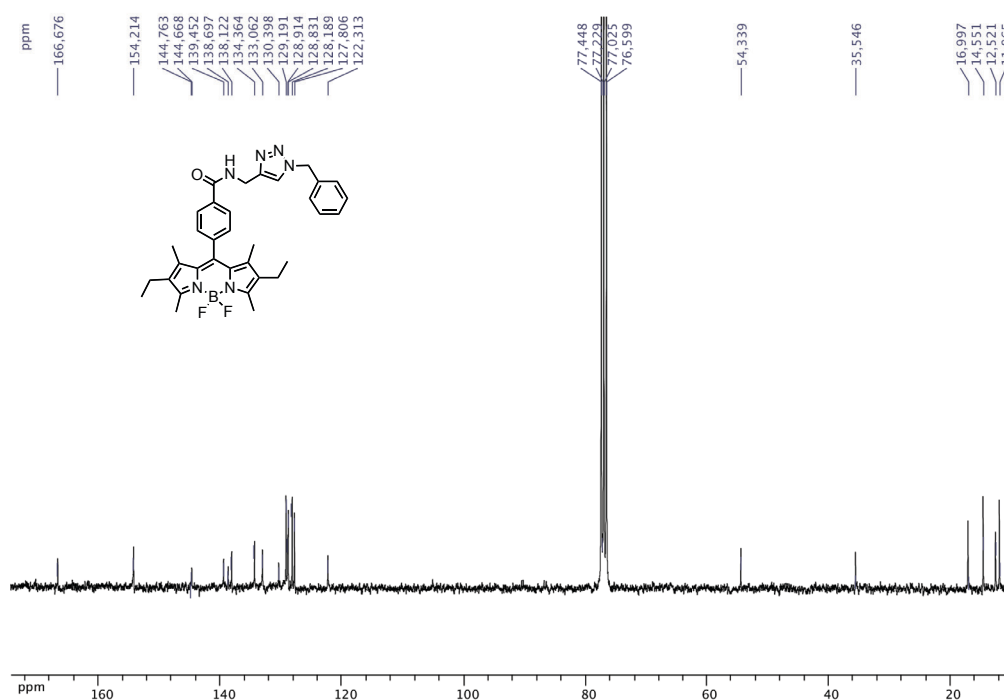
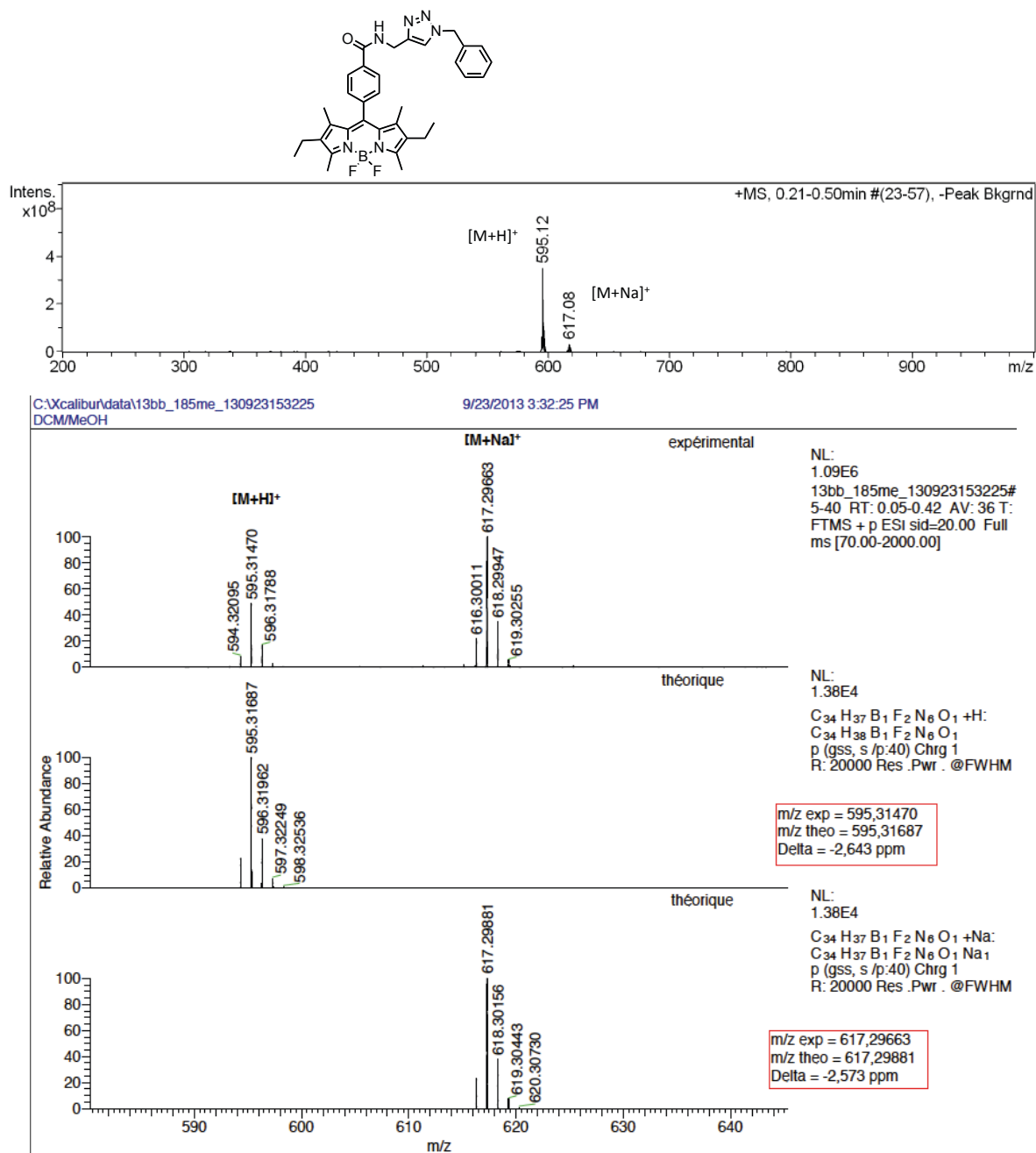
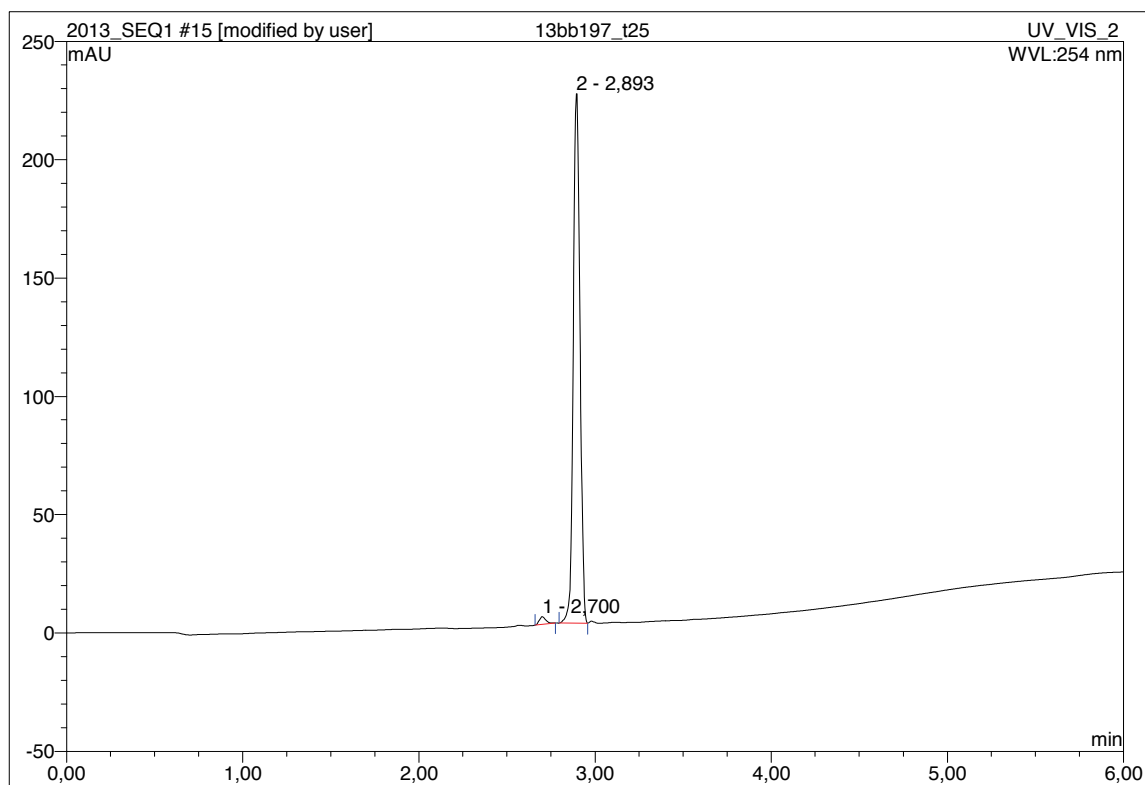


Figure 21: ^1H NMR spectrum of **10** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K)

Figure 22: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **10**.

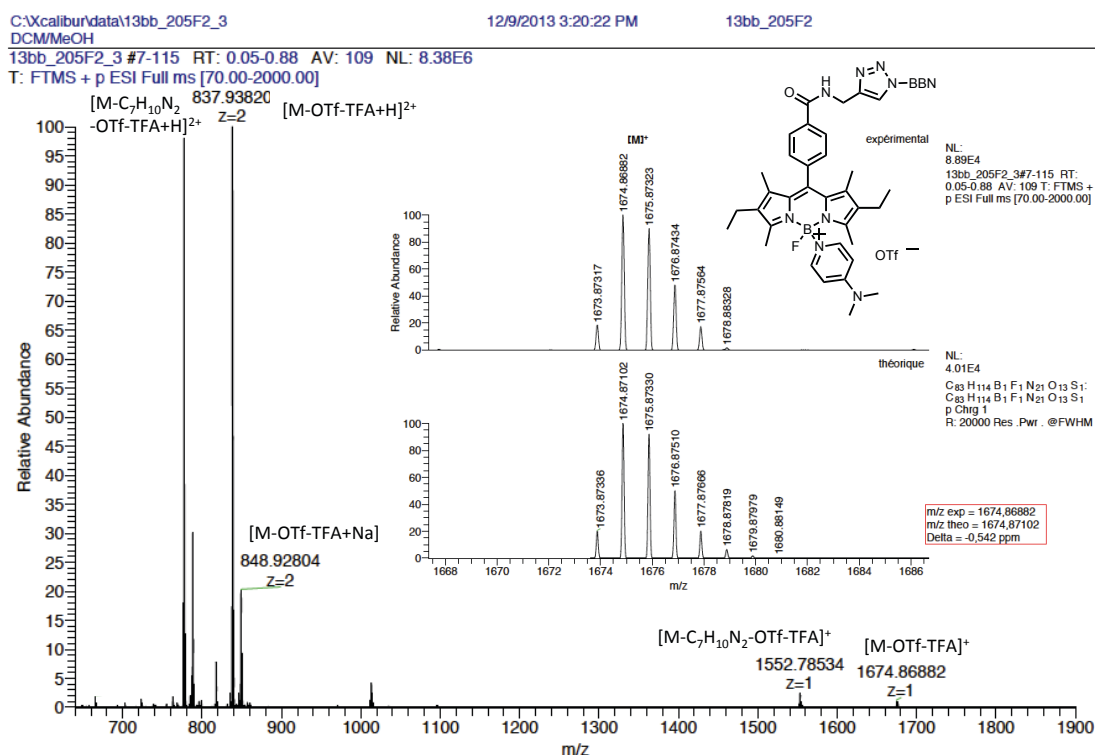
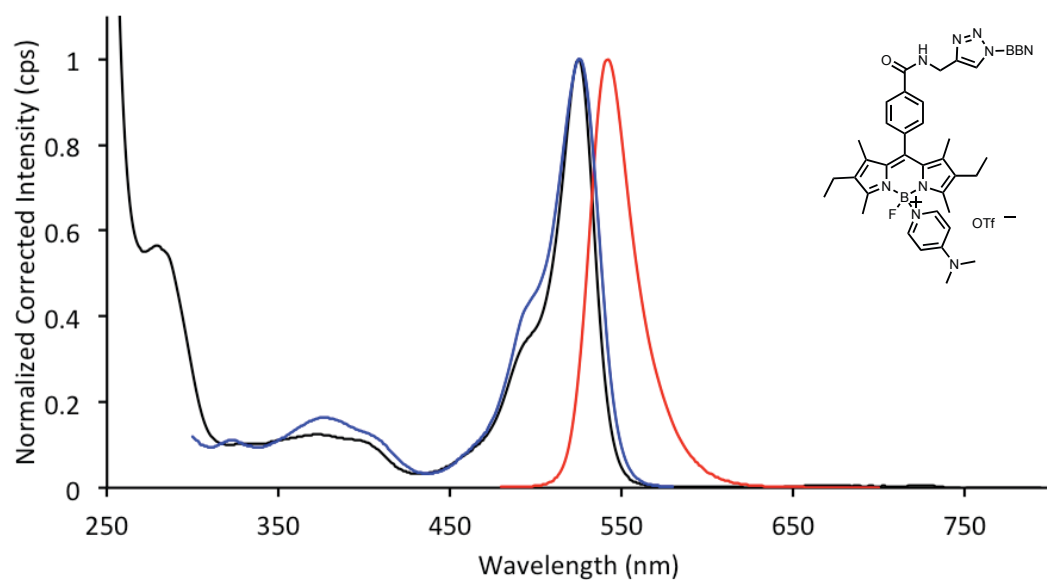
Figure 23: ^1H NMR spectrum of **11** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K).Figure 24: ^{13}C NMR spectrum of **11** (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K).

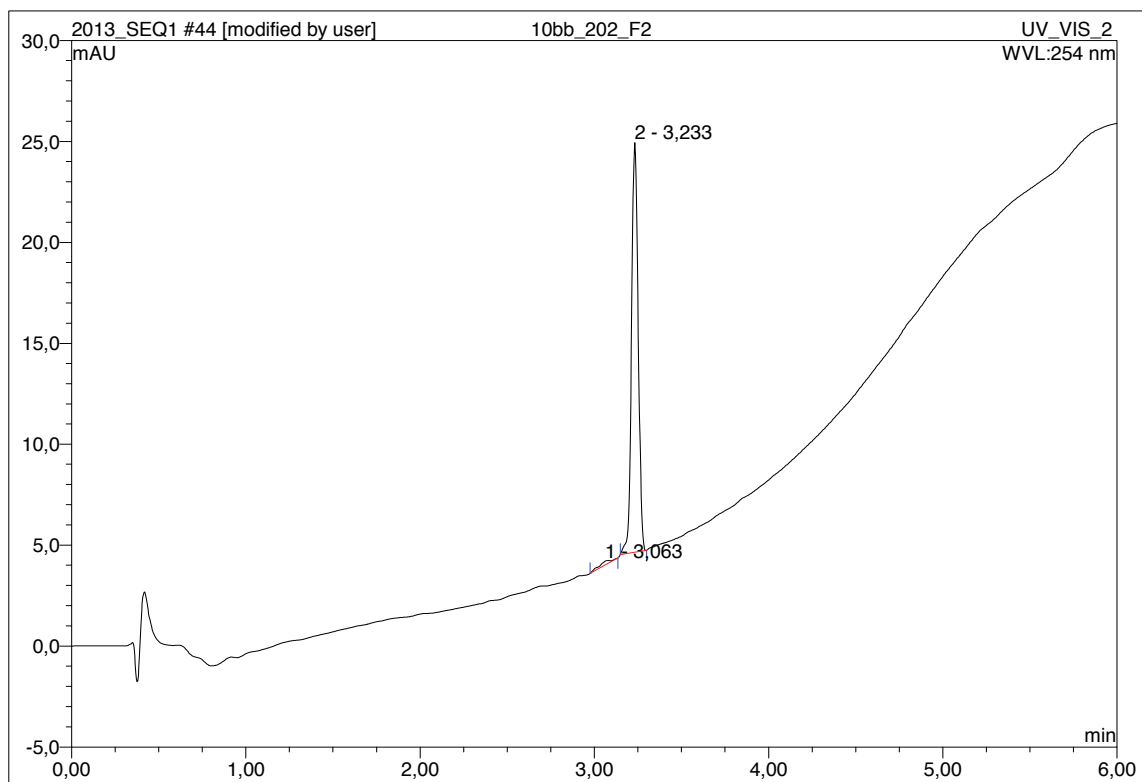
Figure 25: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **11**.



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	2,70	n.a.	3,237	0,140	1,39	n.a.	BMB*
2	2,89	n.a.	223,785	9,884	98,61	n.a.	BMB
Total:			227,022	10,023	100,00	0,000	

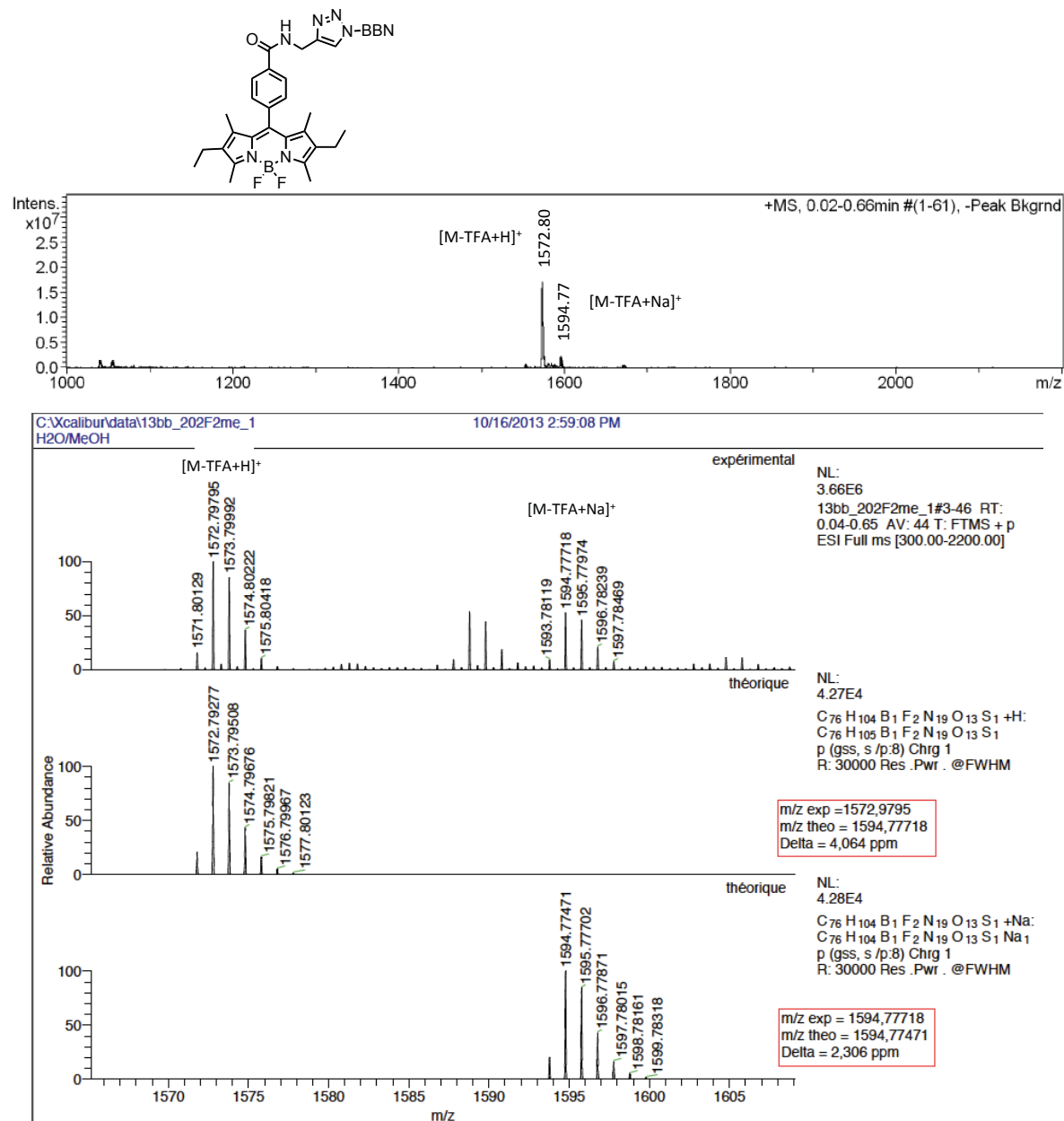
Figure 26: HPLC traces of compound **12** with a detection at 254 nm, method: linear gradient solvent B: 0-100 % in 5 min.

Figure 27: HRMS (ESI) mass spectra of **12**.Figure 28: Absorption (black), fluorescence (red, λ_{ex} = 470 nm) and excitation (blue, λ_{em} = 590 nm) spectra of **12** in DMSO at room temperature.



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	3,06	n.a.	0,186	0,015	1,61	n.a.	BMB*
2	3,23	n.a.	20,294	0,893	98,39	n.a.	BMB*
Total:			20,480	0,908	100,00	0,000	

Figure 29: HPLC traces of **13** with a detection at 254 nm, method: linear gradient solvent B: 0-100 % in 5 min.



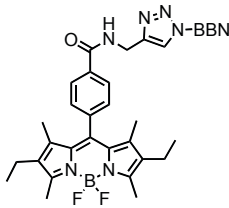
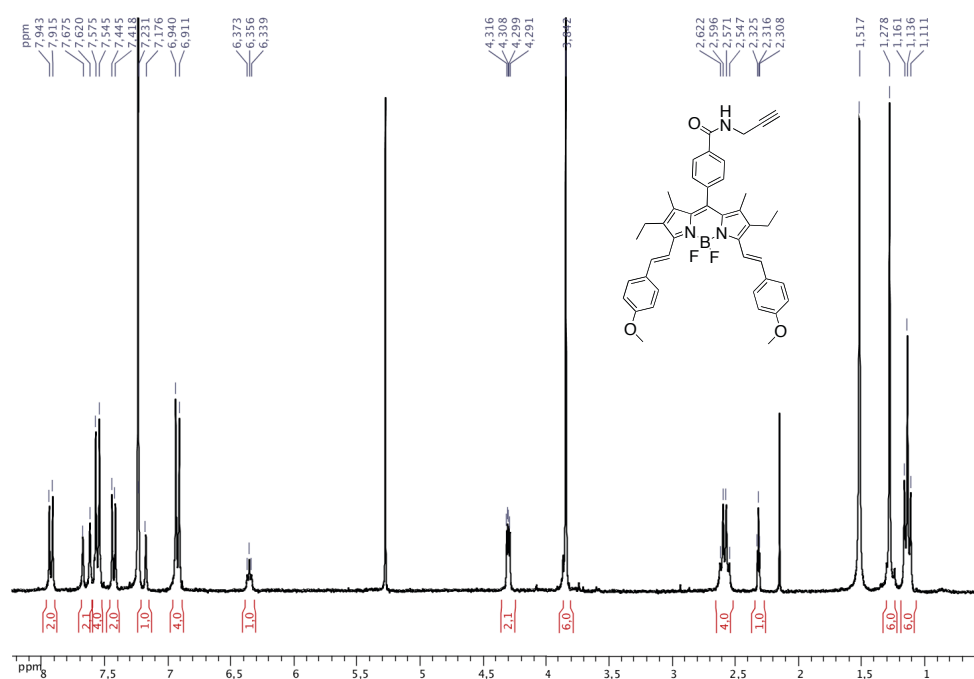
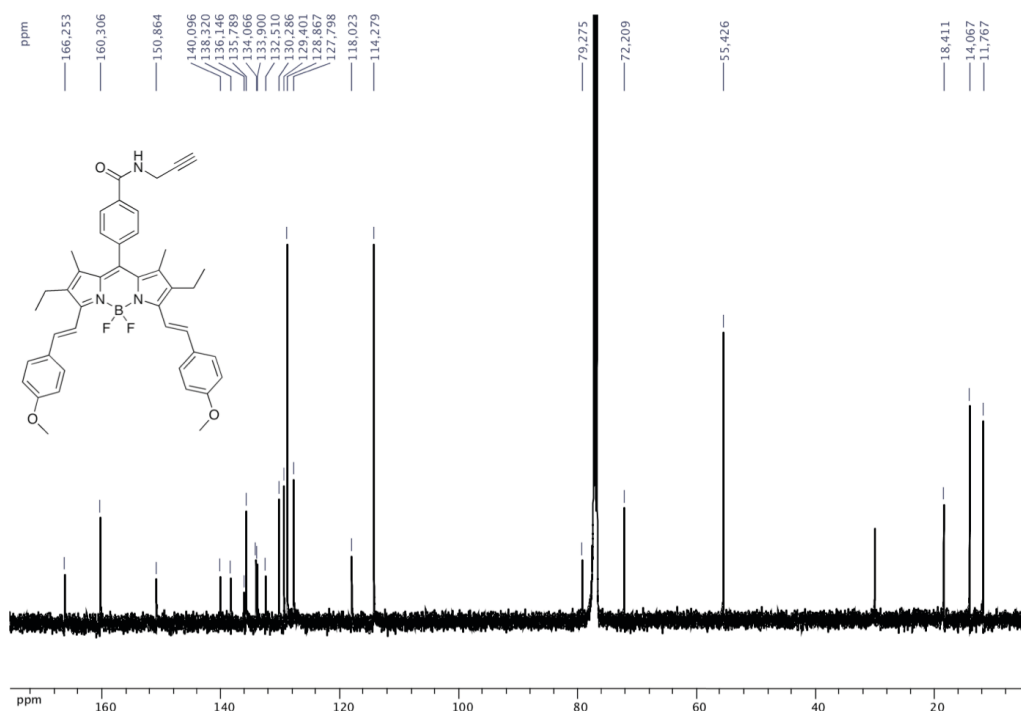
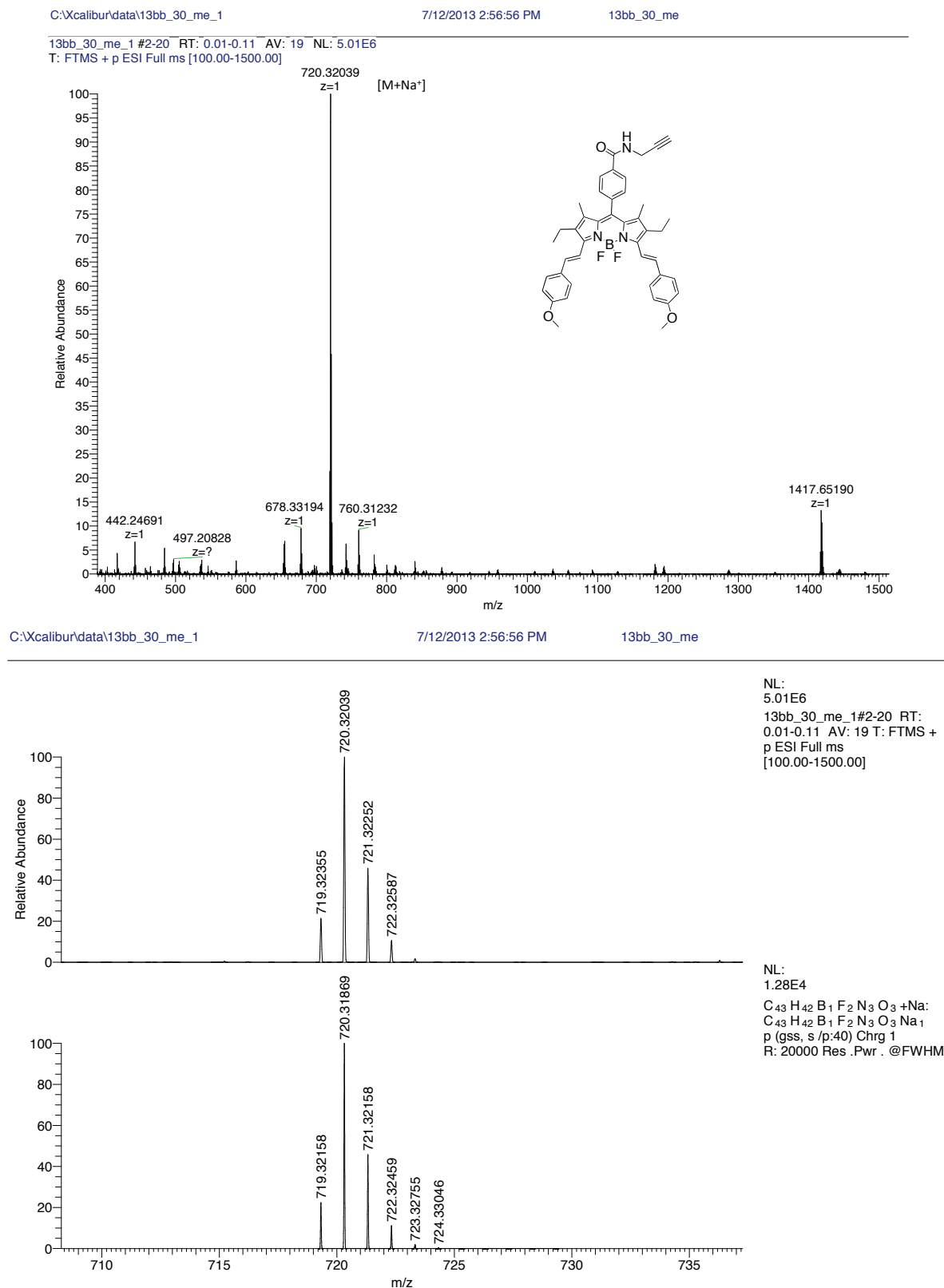


Figure 31: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm) spectra of **13** in DMSO at room temperature.

Figure 32: ¹H NMR spectrum of **15** (CDCl₃, 300 MHz, 298 K).Figure 33: ¹³C NMR spectrum of **15** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K).

Figure 34: HRMS (ESI) mass spectra of **15** (up = experimental, down = theoretical).

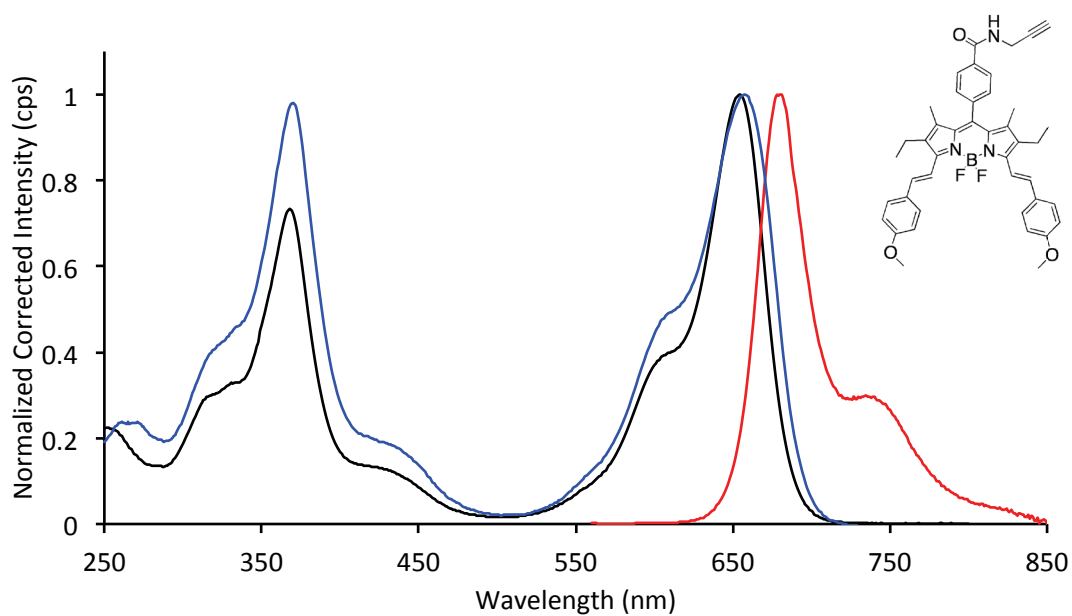


Figure 35: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 750$ nm) spectra of **15** in 2-MeTHF at room temperature.

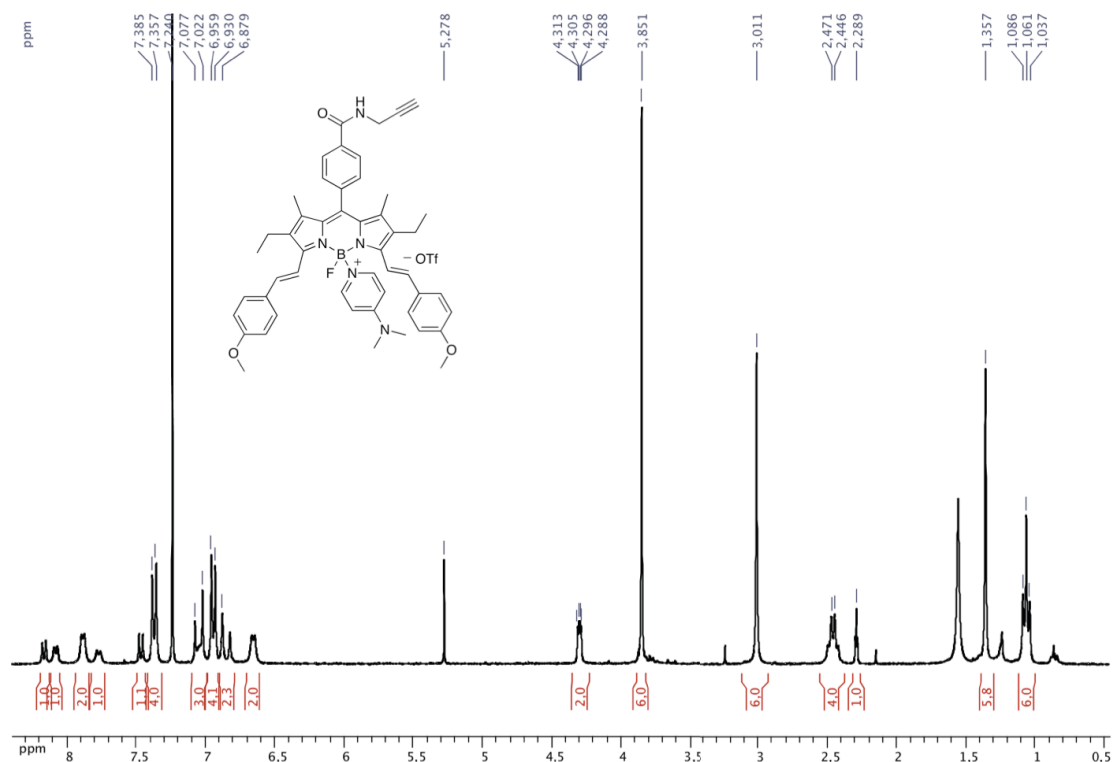
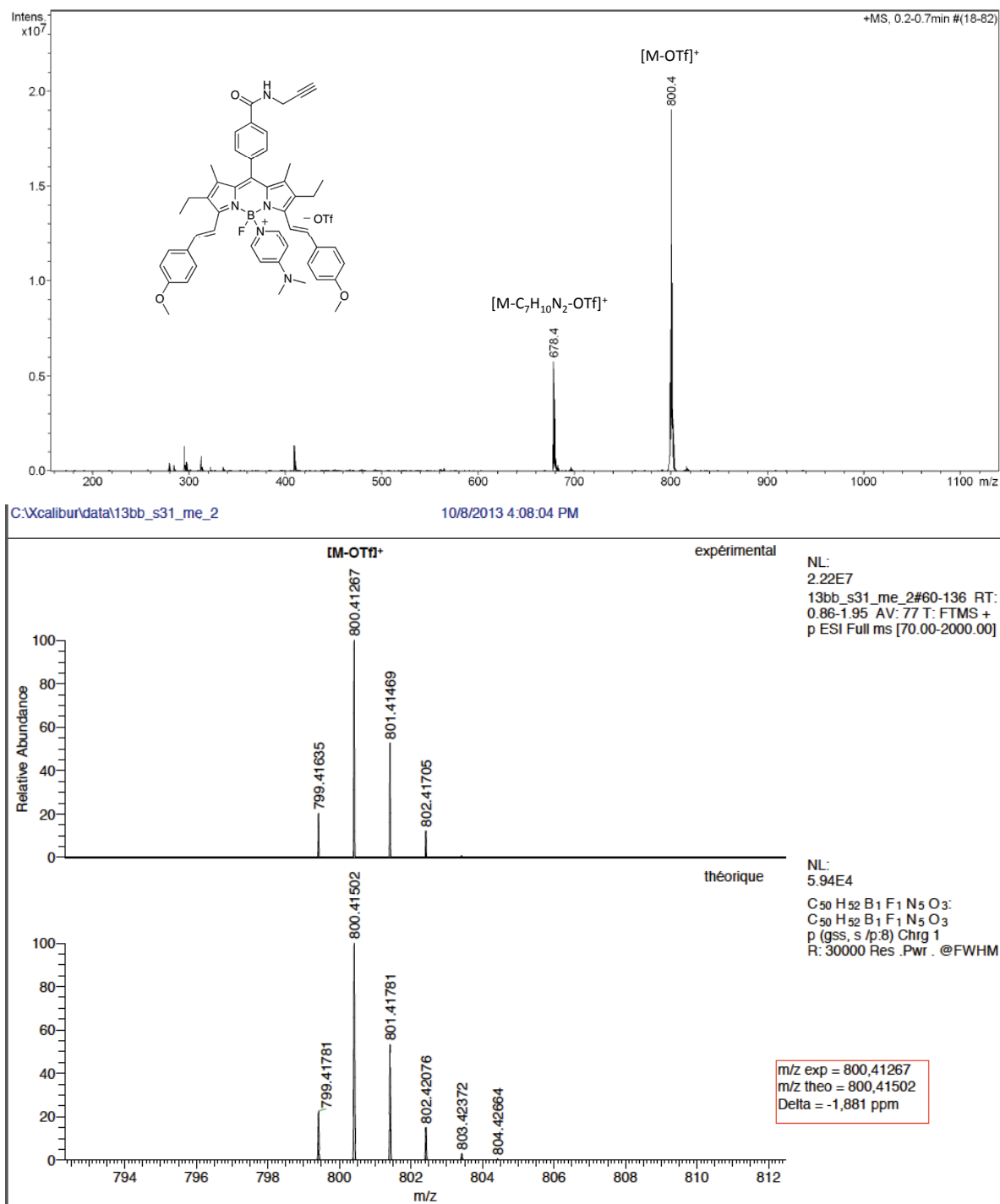


Figure 36: ^1H NMR spectrum of **16** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K).

Figure 37: ESI spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **16**.

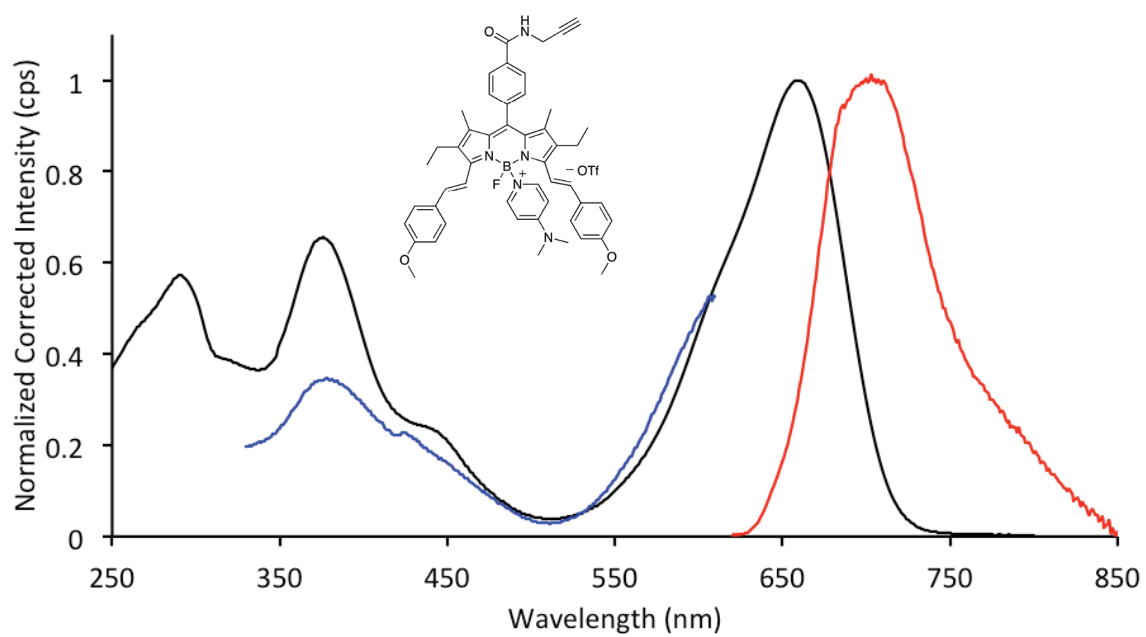
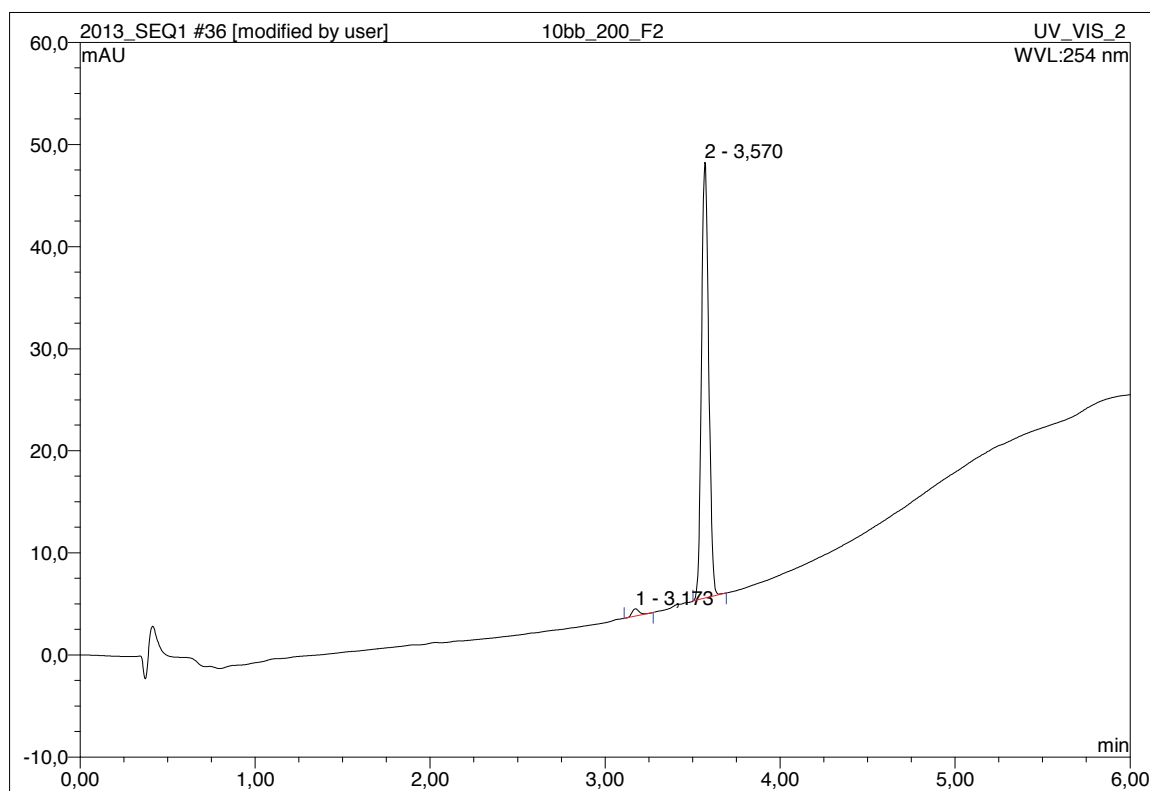
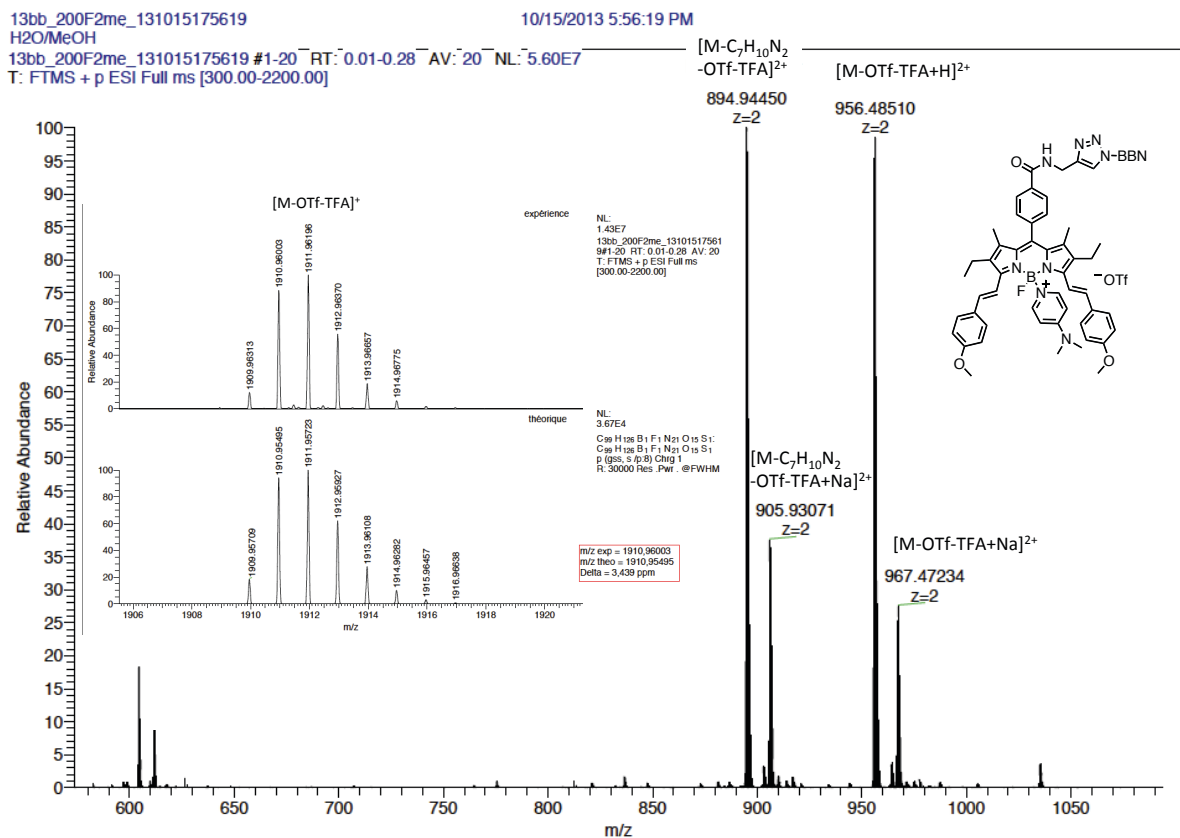
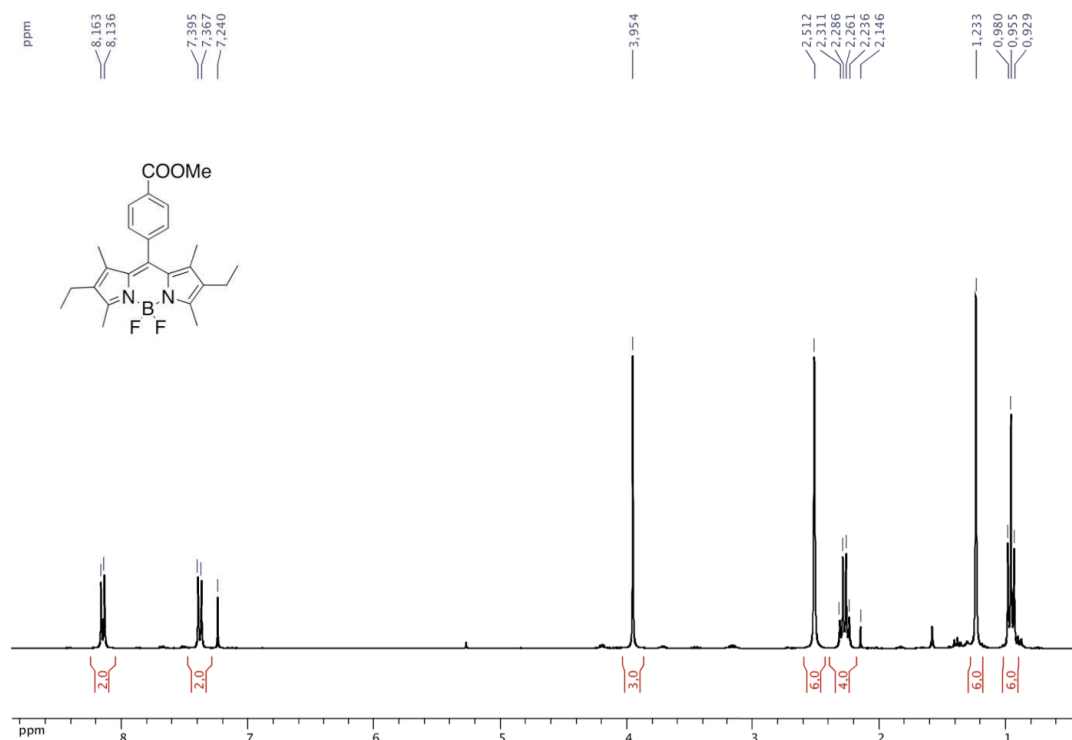


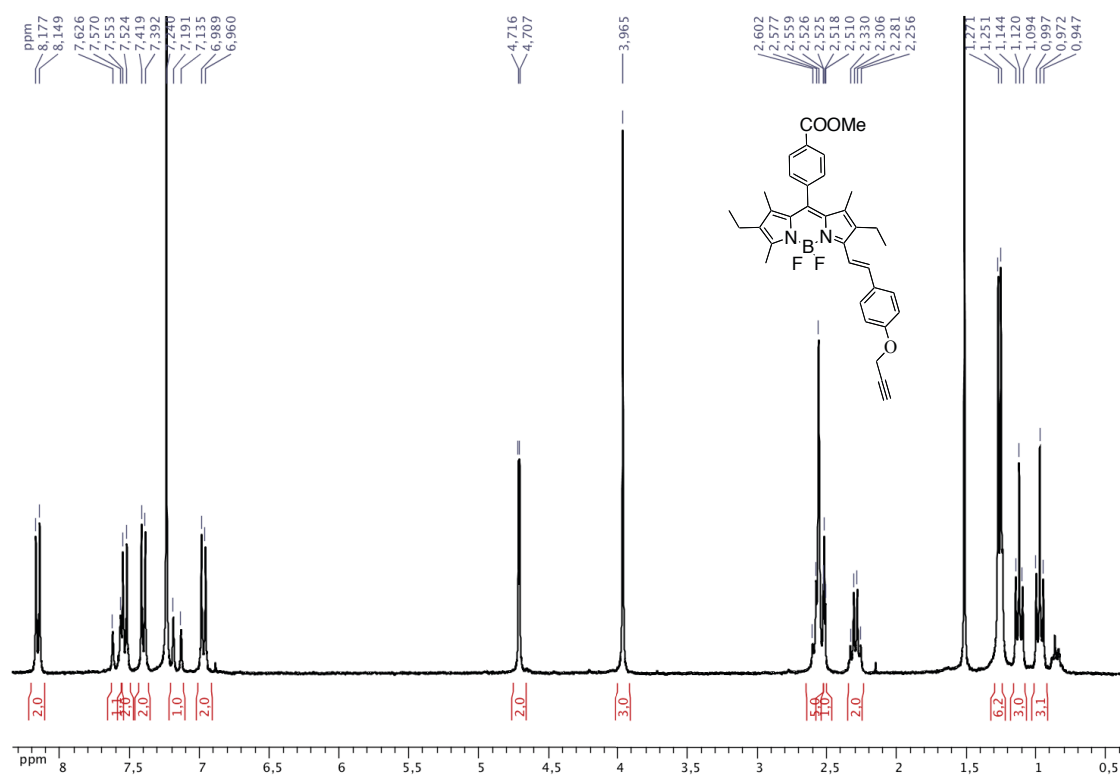
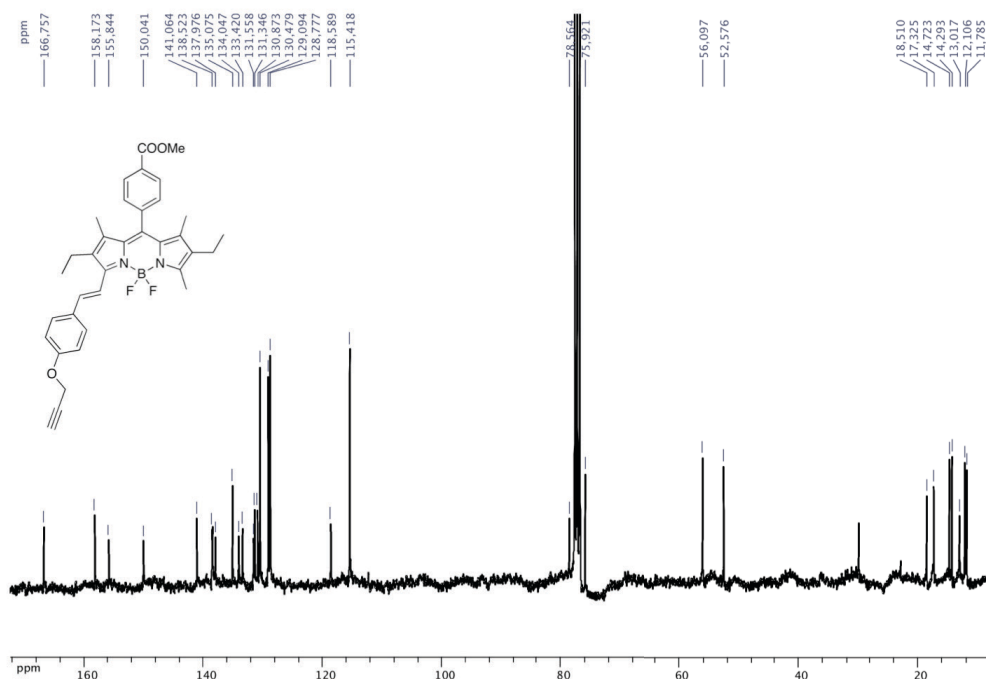
Figure 38: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 560$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 780$ nm) spectra of **16** in 2-MeTHF at room temperature.



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	3,17	n.a.	0,715	0,034	1,63	n.a.	BMB*
2	3,57	n.a.	42,703	2,039	98,37	n.a.	BMB*
Total:			43,418	2,073	100,00	0,000	

Figure 39: HPLC traces of **17** with a detection at 254 nm, method: linear gradient solvent B: 0-100 % in 5 min.

Figure 40: HRMS (ESI) mass spectra of **17**.Figure 41: ¹H NMR spectrum of **18** in CDCl₃.

Figure 42: ¹H NMR spectrum of **19** (CDCl₃, 300 MHz, 298 K).Figure 43: ¹³C NMR spectrum of **19** (CDCl₃, 75 MHz, 298 K).

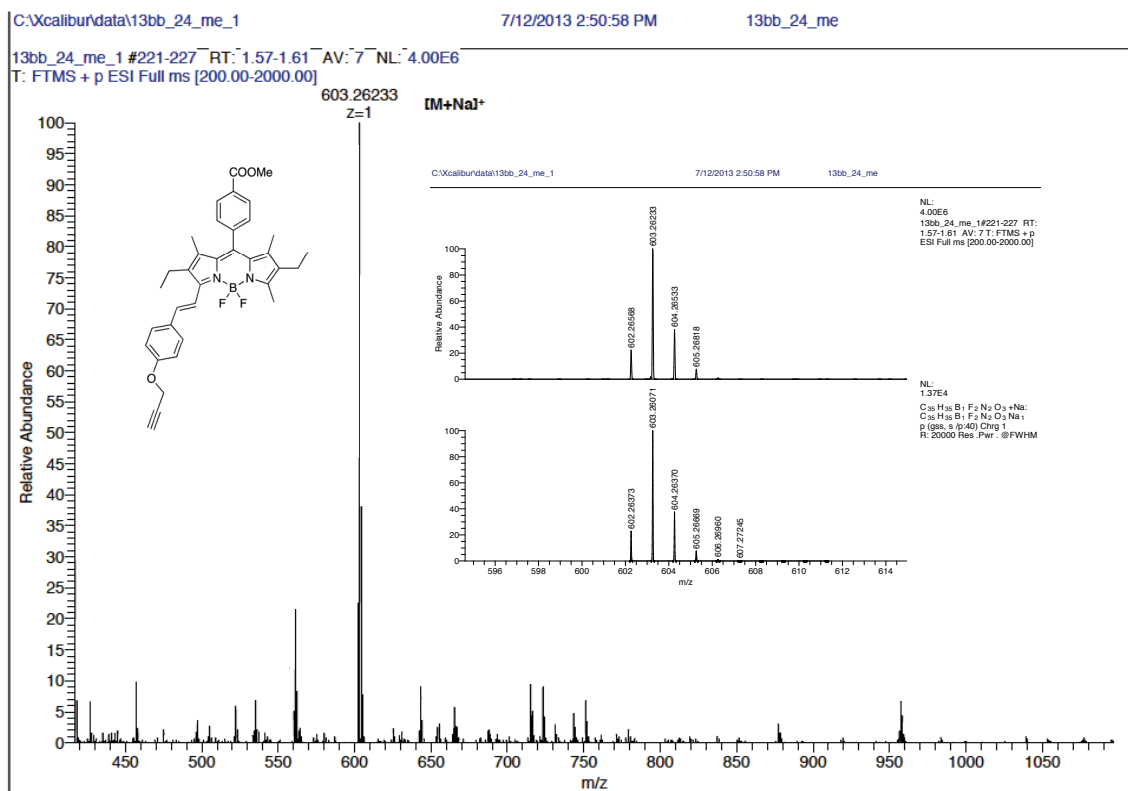


Figure 44: HRMS (ESI) mass spectra of **19** (up = experimental, down = theoretical).

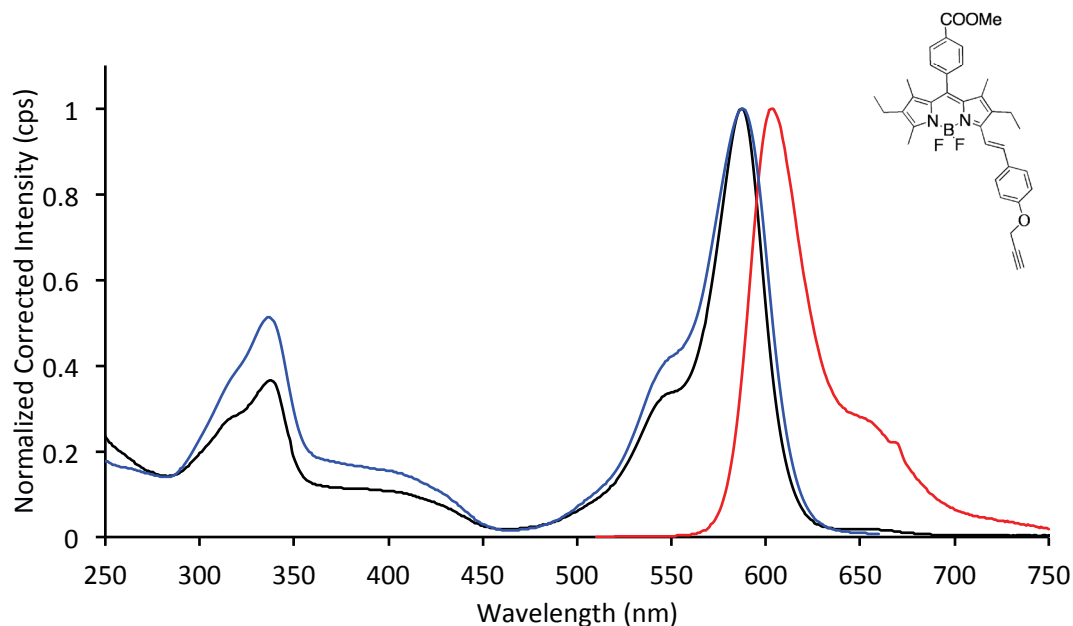


Figure 45: Absorption (black), fluorescence (red, λ_{ex} = 510 nm) and excitation (blue, λ_{em} = 670 nm) spectra of **19** in 2-MeTHF at room temperature.

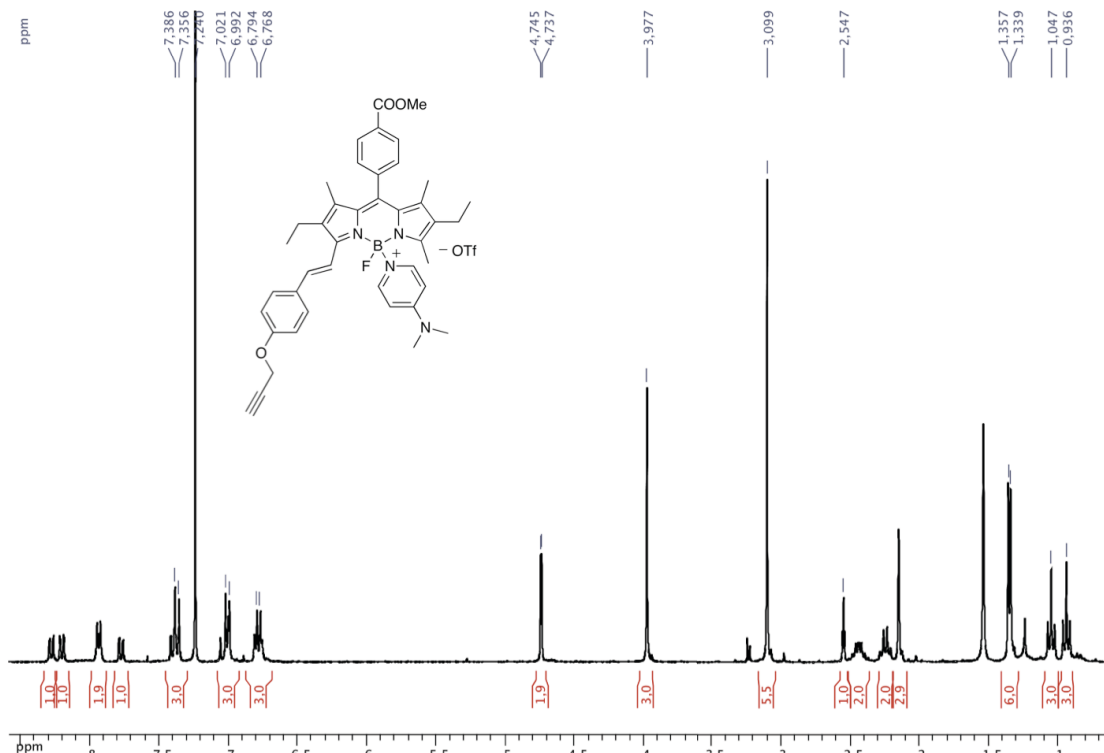


Figure 46: ^1H NMR spectrum of **20** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K).

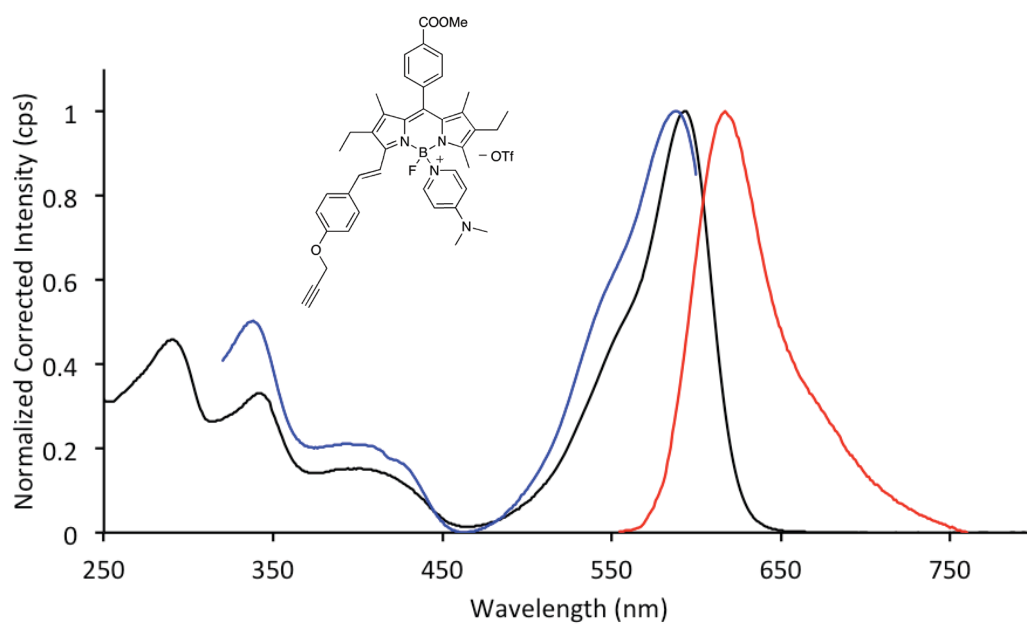


Figure 47: Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 510$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm) spectra of **20** in 2-MeTHF at room temperature.

$[M-OTf]^+$

683.35465
z=1

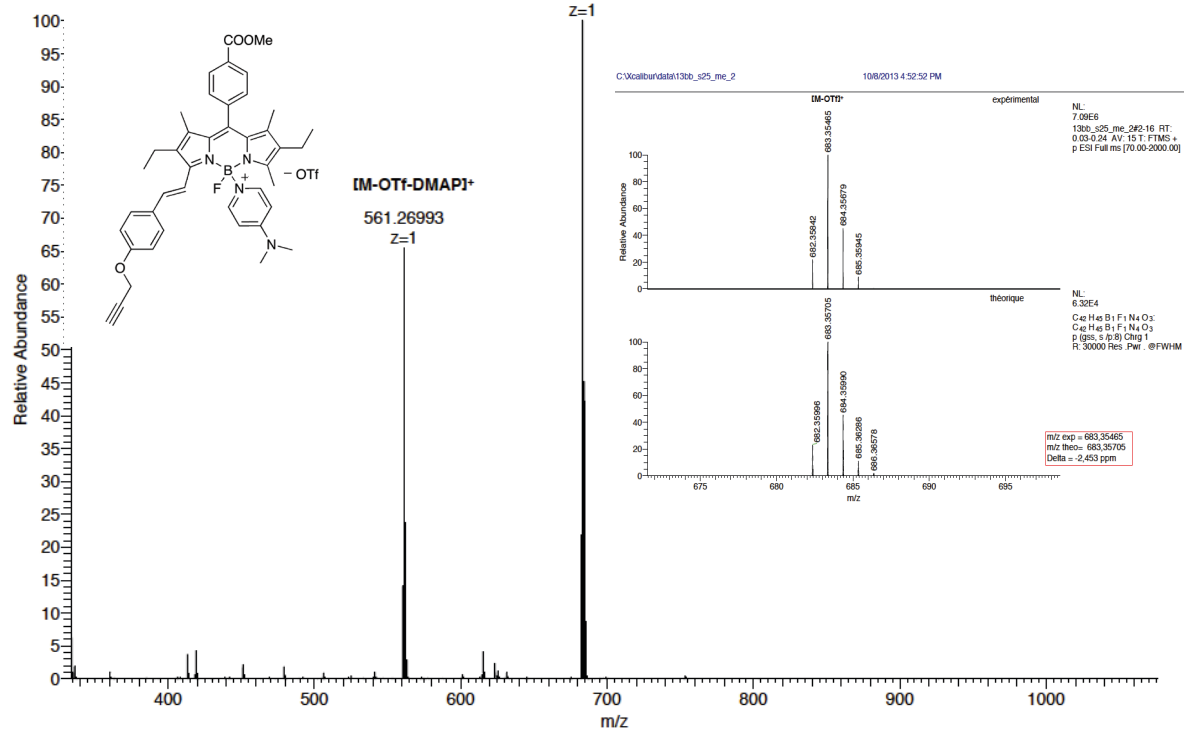
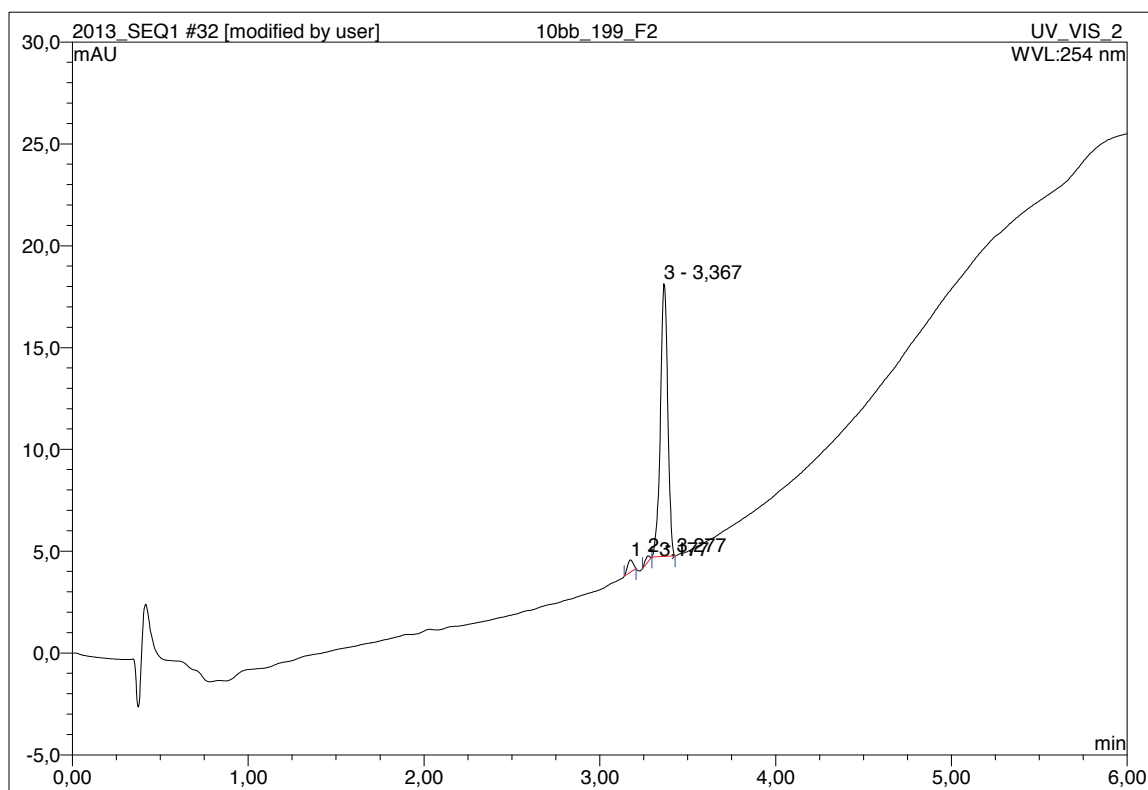
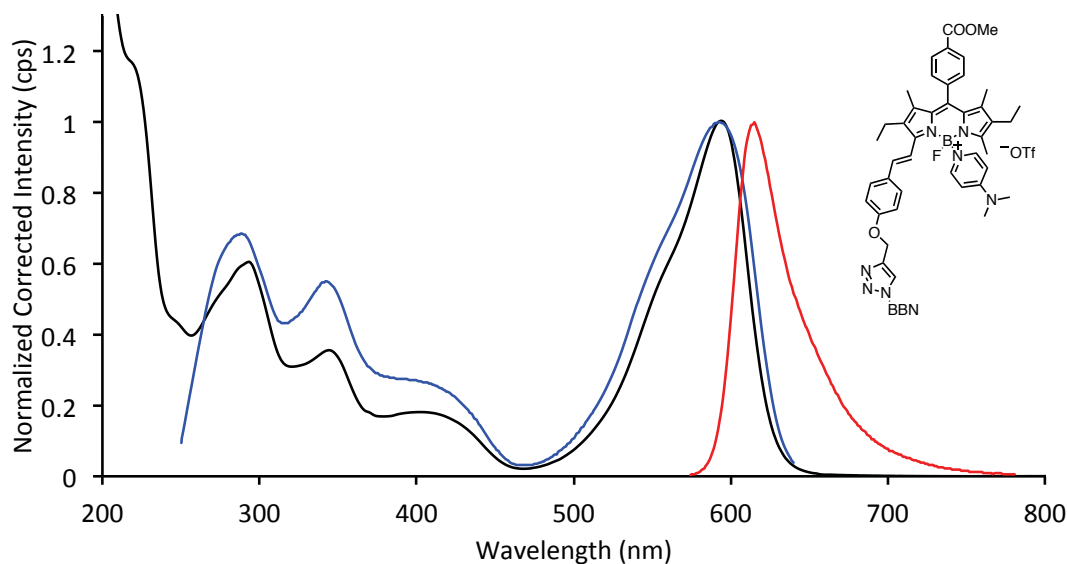
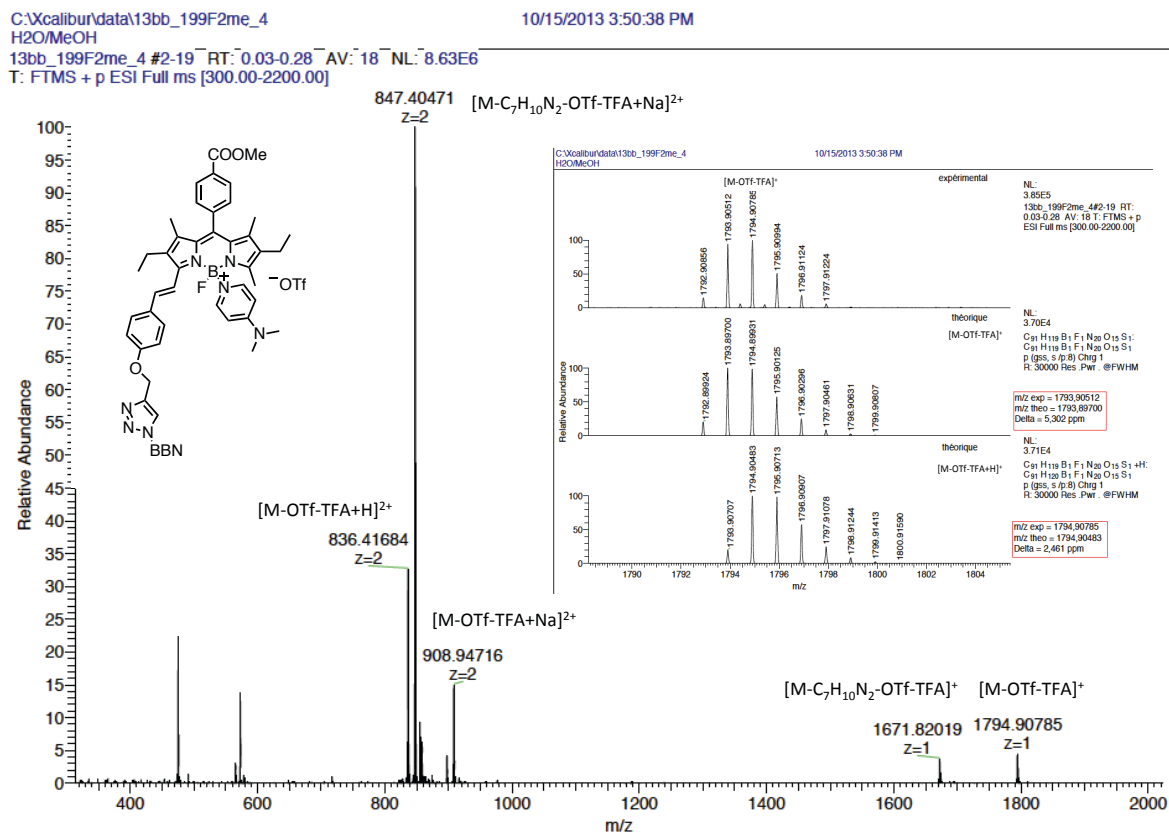


Figure 48: HRMS (ESI) mass spectra of **20**.



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount	Type
1	3,18	n.a.	0,599	0,023	3,37	n.a.	BMB*
2	3,28	n.a.	0,268	0,009	1,27	n.a.	BMB*
3	3,37	n.a.	13,405	0,645	95,37	n.a.	bMB*
Total:			14,272	0,676	100,00	0,000	

Figure 49: HPLC traces of **21** with a detection at 254 nm, method: linear gradient solvent B: 0-100 % in 5 min.



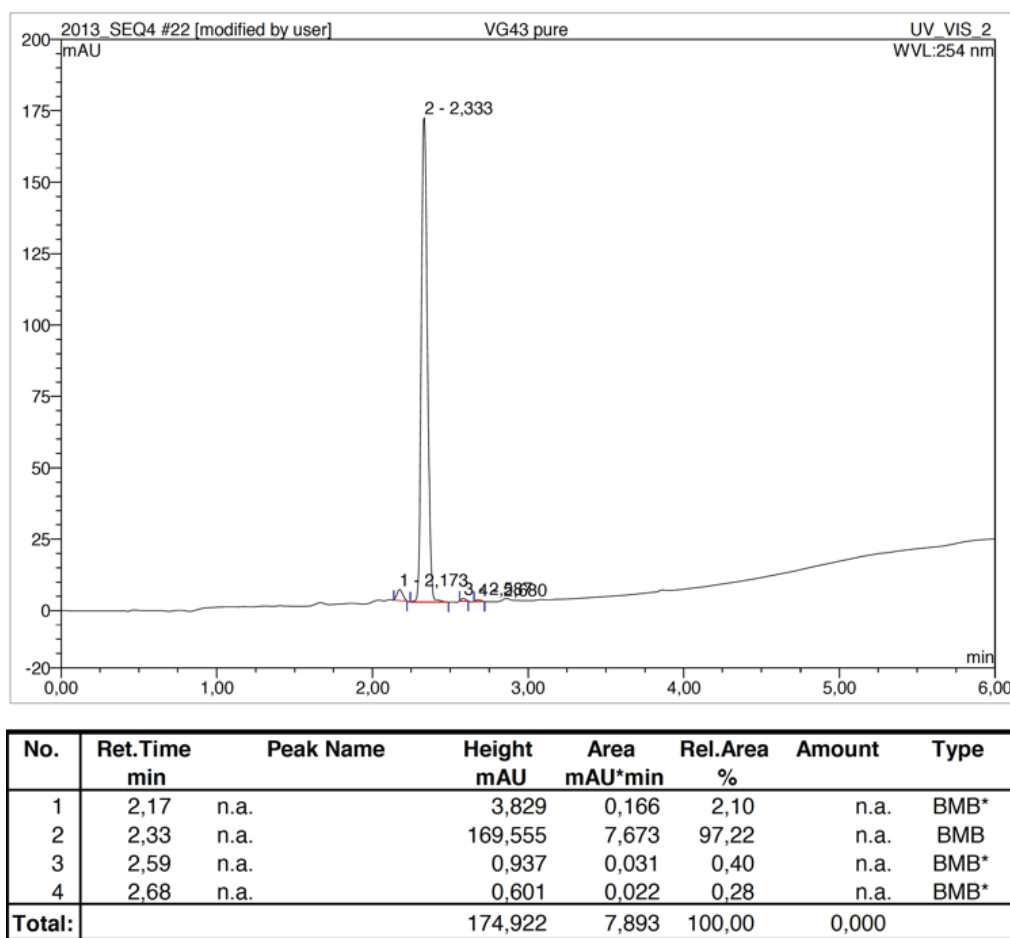


Figure 52: HPLC trace of the peptide **BBN** with a detection at 254 nm, method: linear gradientsolvent B: 0-100 % in 5 min.

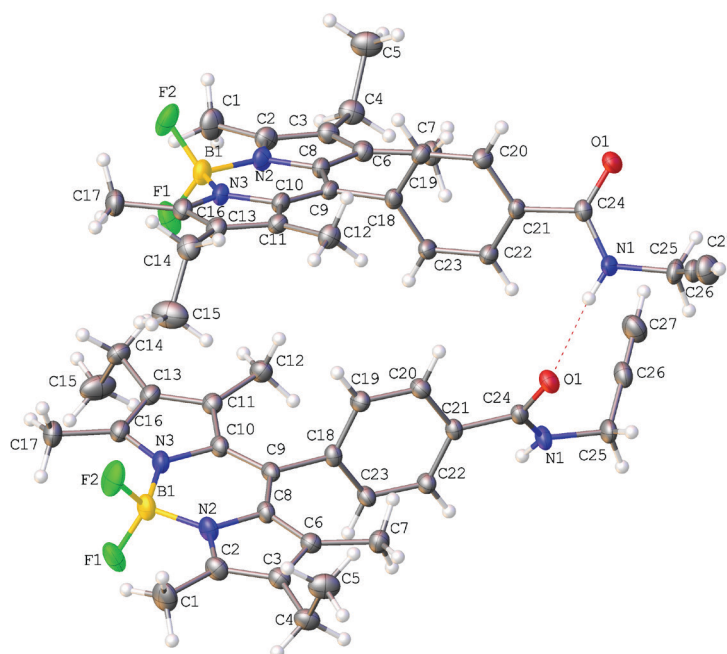


Figure 53: OLEX2 view of hydrogen bonding in **8**.

Annexe 4 : “Supporting Information” de l’article III

B,B-diporphyrinbenzyloxy-BODIPY dyes: Synthesis and Antenna Effect

Bertrand Brizet,^{a,b} Antoine Eggenspiller,^a Claude P. Gros,^{a,*} Jean-Michel Barbe,^a
Christine Goze,^a Franck Denat^a and Pierre D. Harvey^{b,*}

List of figures:

Figure S1:	¹ H NMR spectrum of BODIPY-ester	326
Figure S2:	¹ H NMR spectrum of BODIPY 1	327
Figure S3:	¹³ C NMR spectrum of 1	328
Figure S4:	Experimental and calculated HR-MS mass spectrum of BODIPY 1	329
Figure S5:	¹ H NMR spectrum of 5-(4-(carboxy)-phenyl)-10,15,20-tritolyldiporphyrin Zinc (starting precursor)	330
Figure S6:	¹ H NMR spectrum of 2	331
Figure S7:	¹³ C NMR spectrum of 2	332
Figure S8:	¹ H NMR spectrum of 3	333
Figure S9:	¹³ C NMR spectrum of 3	334
Figure S10:	HR-MS mass spectrum of 3	335
Figure S11:	¹ H NMR spectrum of 4	336
Figure S12:	¹³ C NMR spectrum of 4	337
Figure S13:	Experimental and calculated HR-MS mass spectrum of 4	338
Figure S14:	Absorption spectra of compounds 1 , ZnTPP and compound 4	339
Figure S15:	Absorption spectra of compounds 1 , 2 and 3	340
Figure S16:	Emission spectra of compounds 4 , 1 , and ZnTPP	341

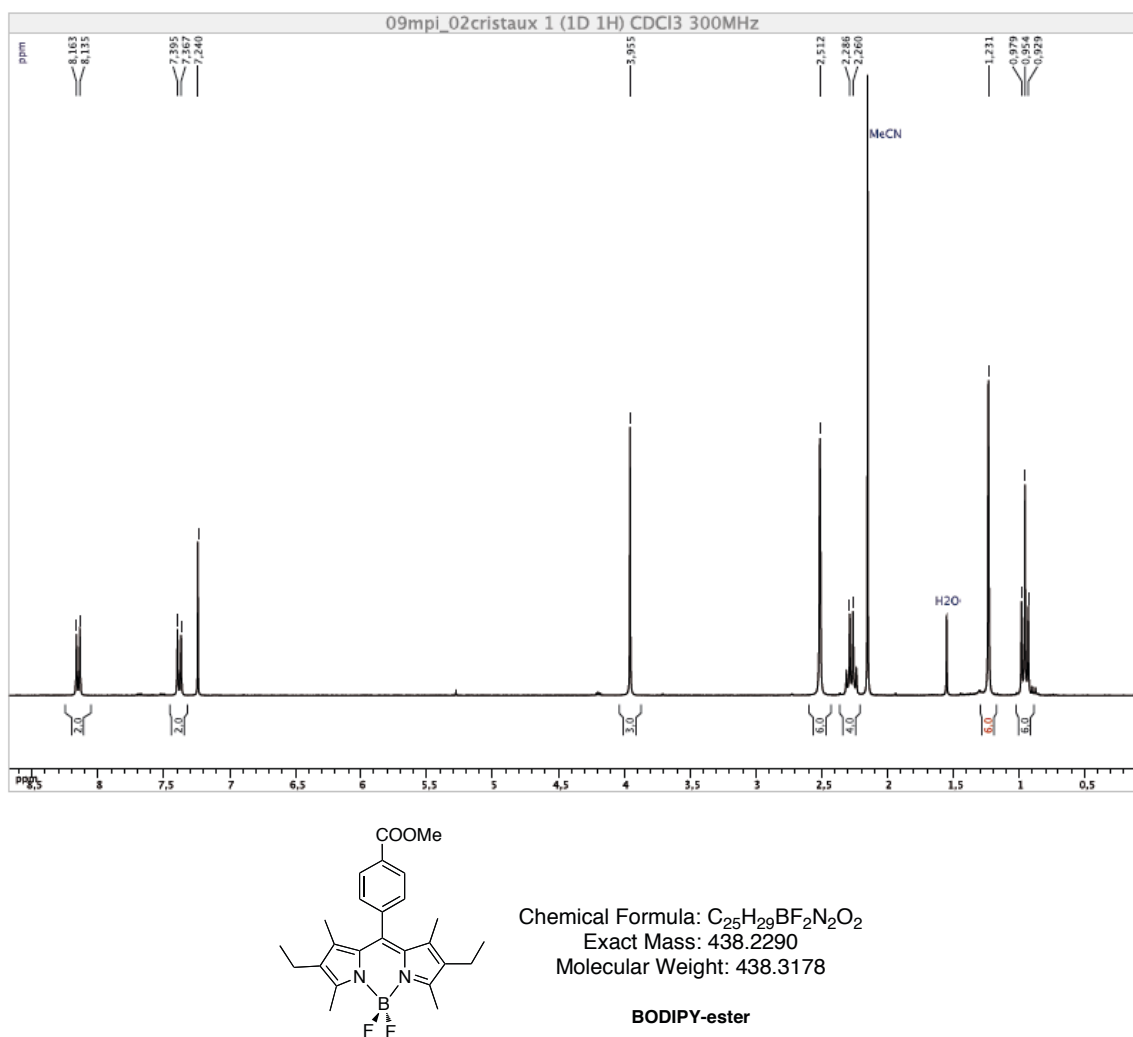


Figure S1: ^1H NMR (300 MHz, 298 K, CDCl_3) spectrum of BODIPY-ester

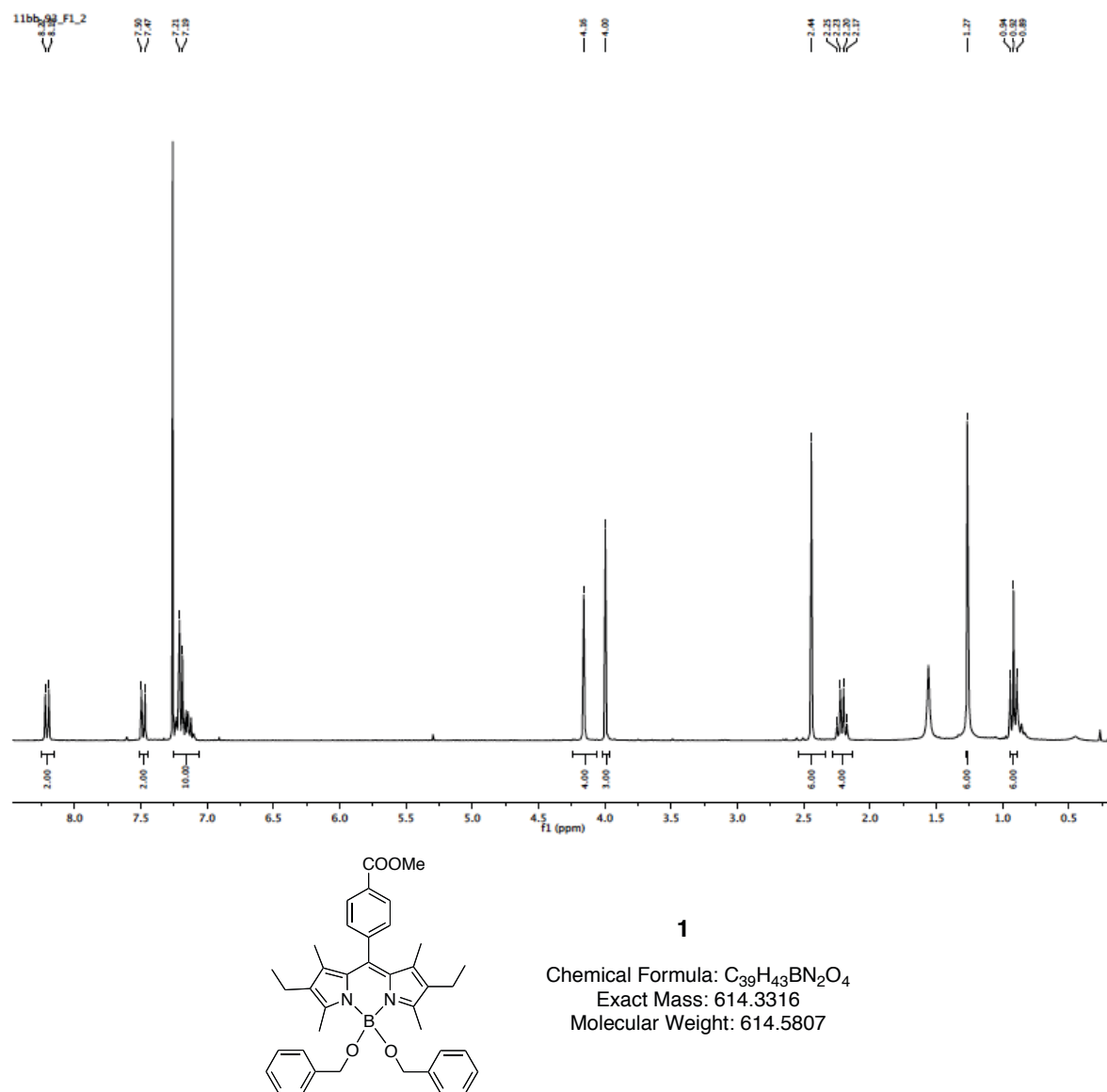
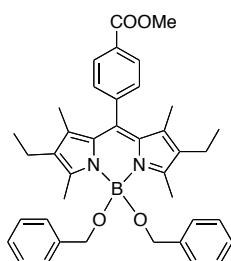
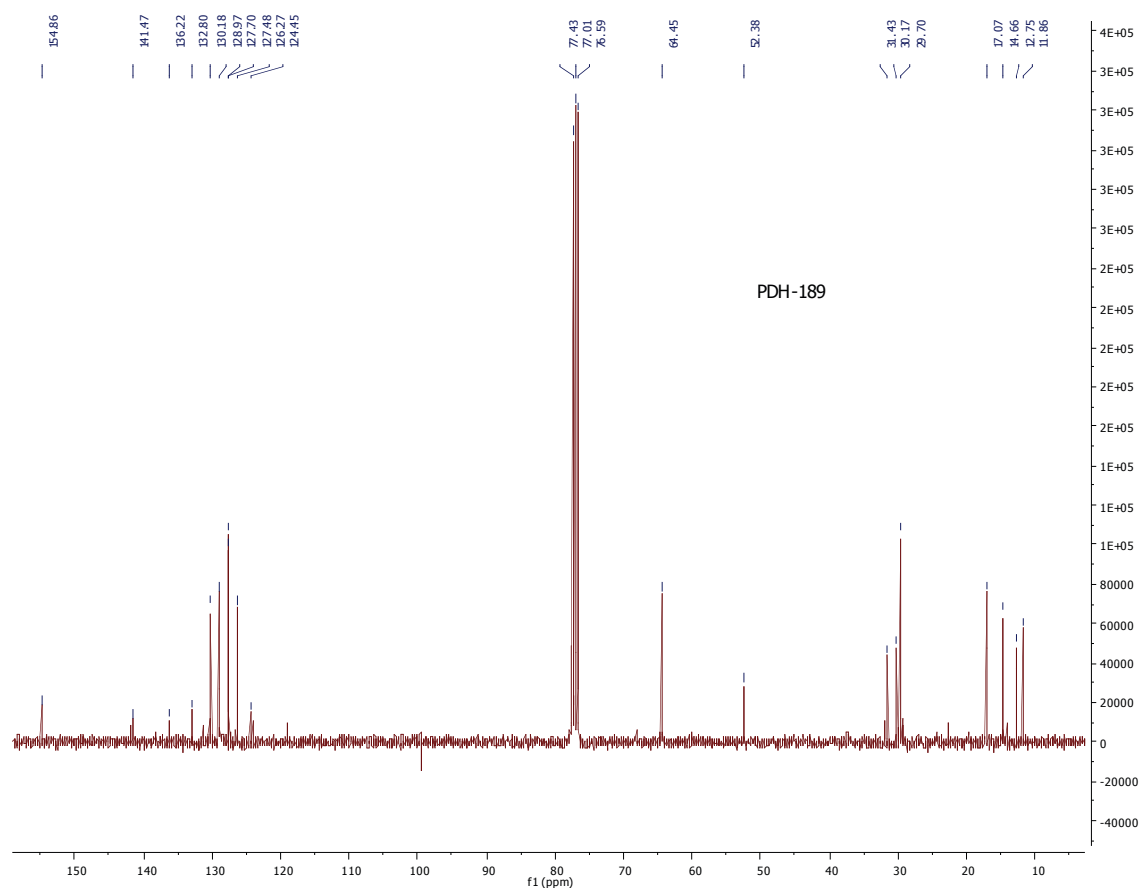


Figure S2: ^1H NMR (300 MHz, 298 K, CDCl_3) spectrum of BODIPY **1**

**1**

Chemical Formula: C₃₉H₄₃BN₂O₄
 Exact Mass: 614.3316
 Molecular Weight: 614.5807

Figure S3: ¹³C NMR (75 MHz, 298 K, CDCl₃) spectrum of **1**

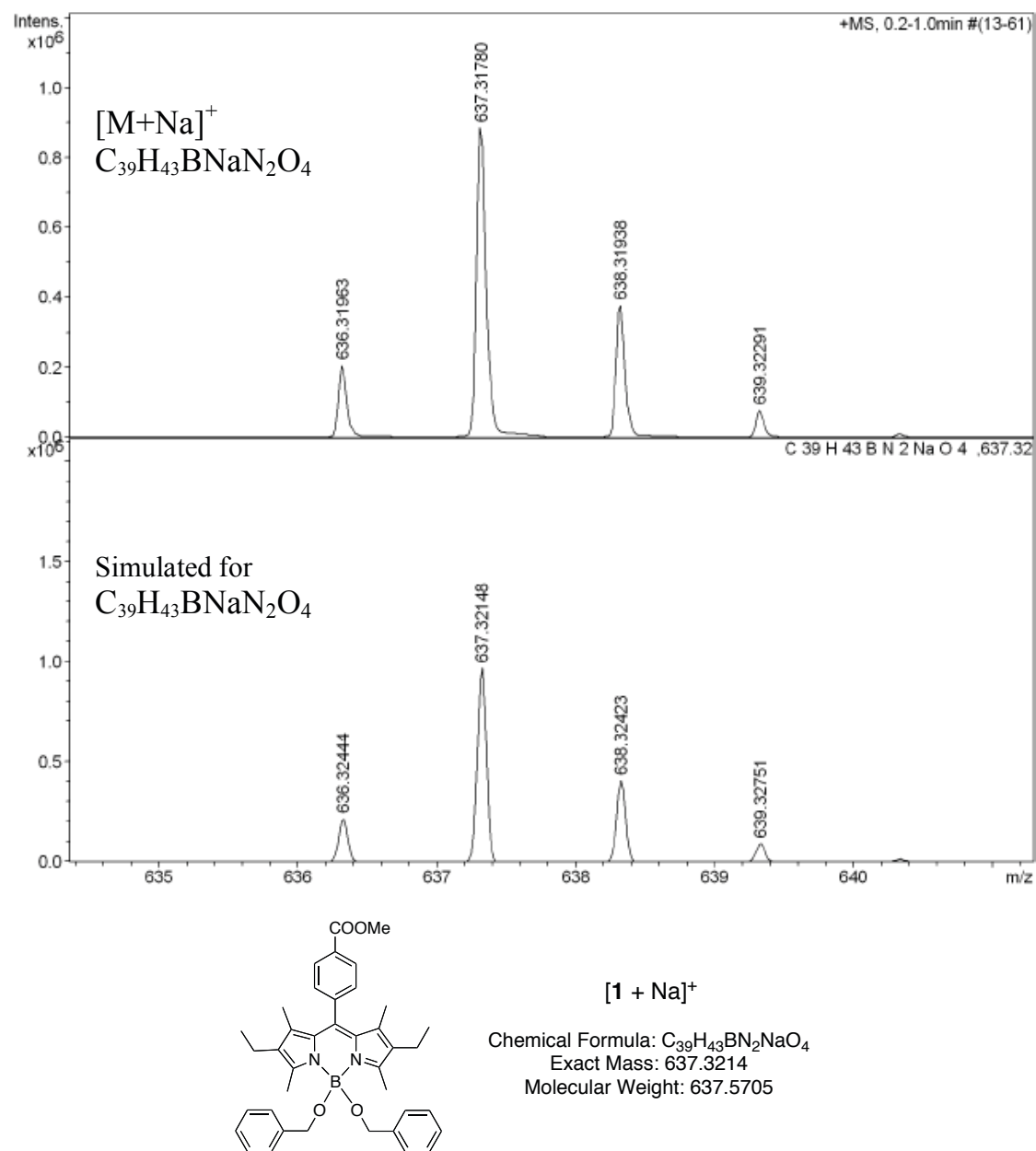


Figure S4: Experimental and calculated HR-MS (ESI-QTOF) mass spectrum of BODIPY 1

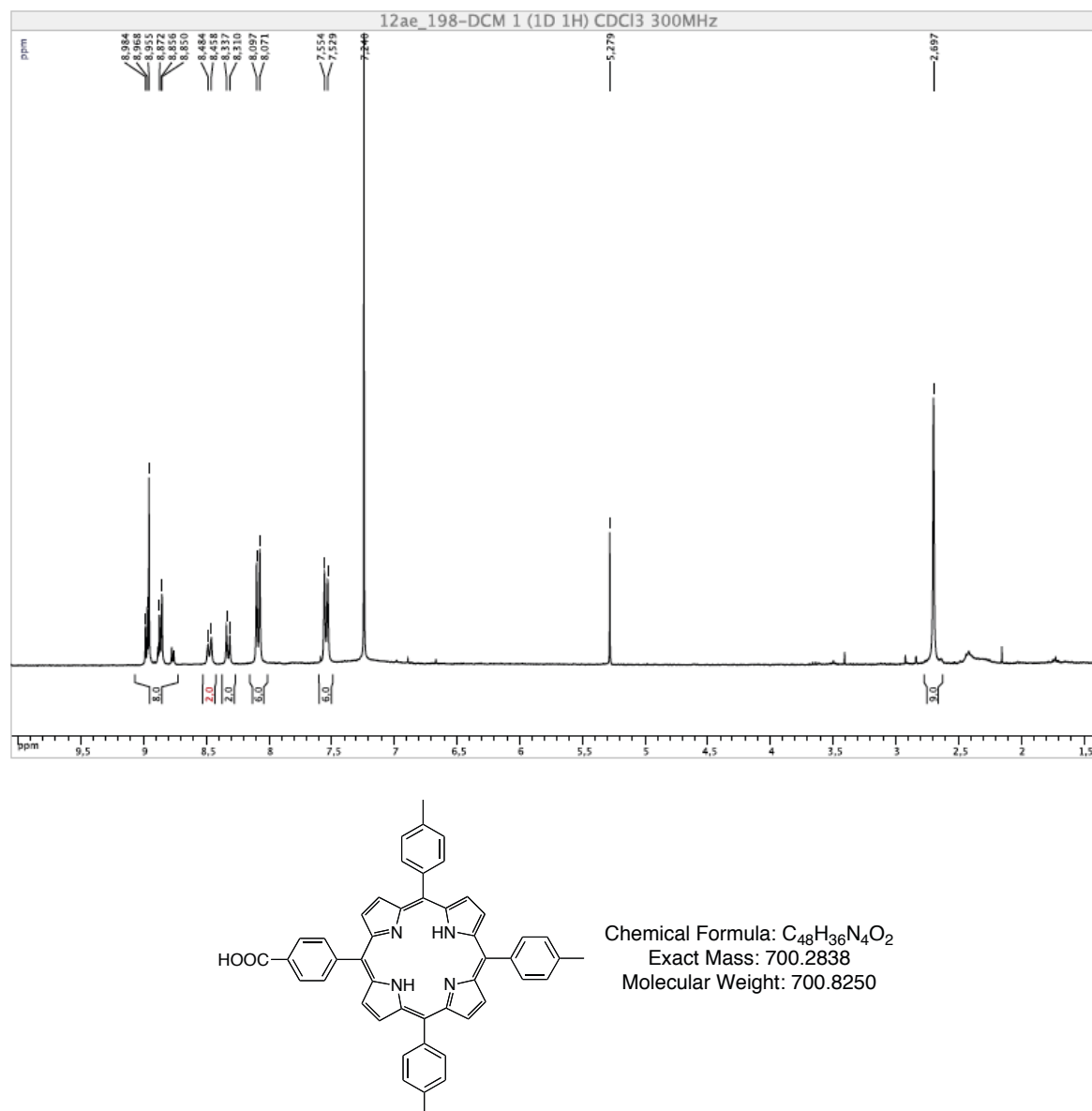
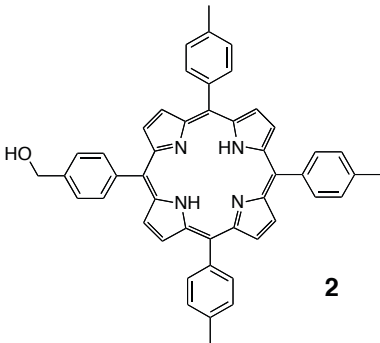
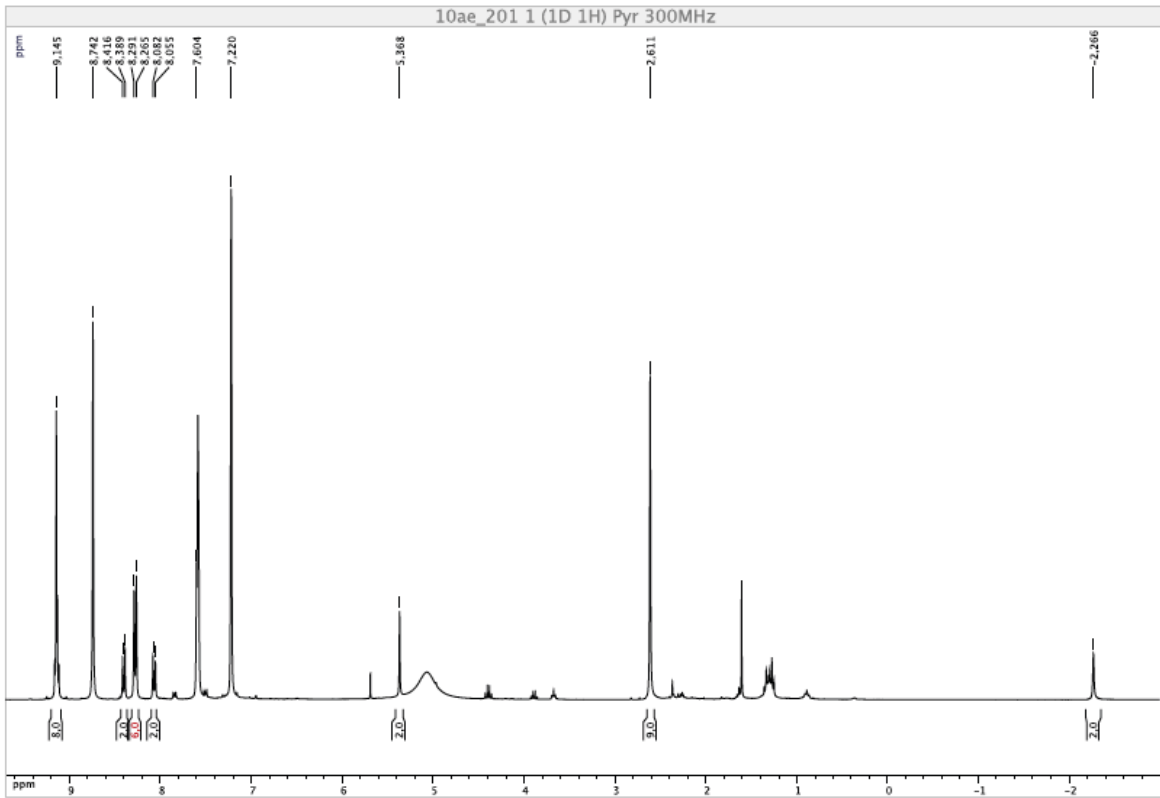


Figure S5: ¹H NMR spectrum (300 MHz, 298 K, CDCl₃) of 5-(4-(carboxy)phenyl)-10,15,20-tritolylporphyrin Zinc (starting precursor)



Chemical Formula: $C_{48}H_{38}N_4O$
Exact Mass: 686.3046
Molecular Weight: 686.8415

Figure S6: ^1H NMR (300 MHz, 298 K, pyridine- D_5) spectrum of **2**

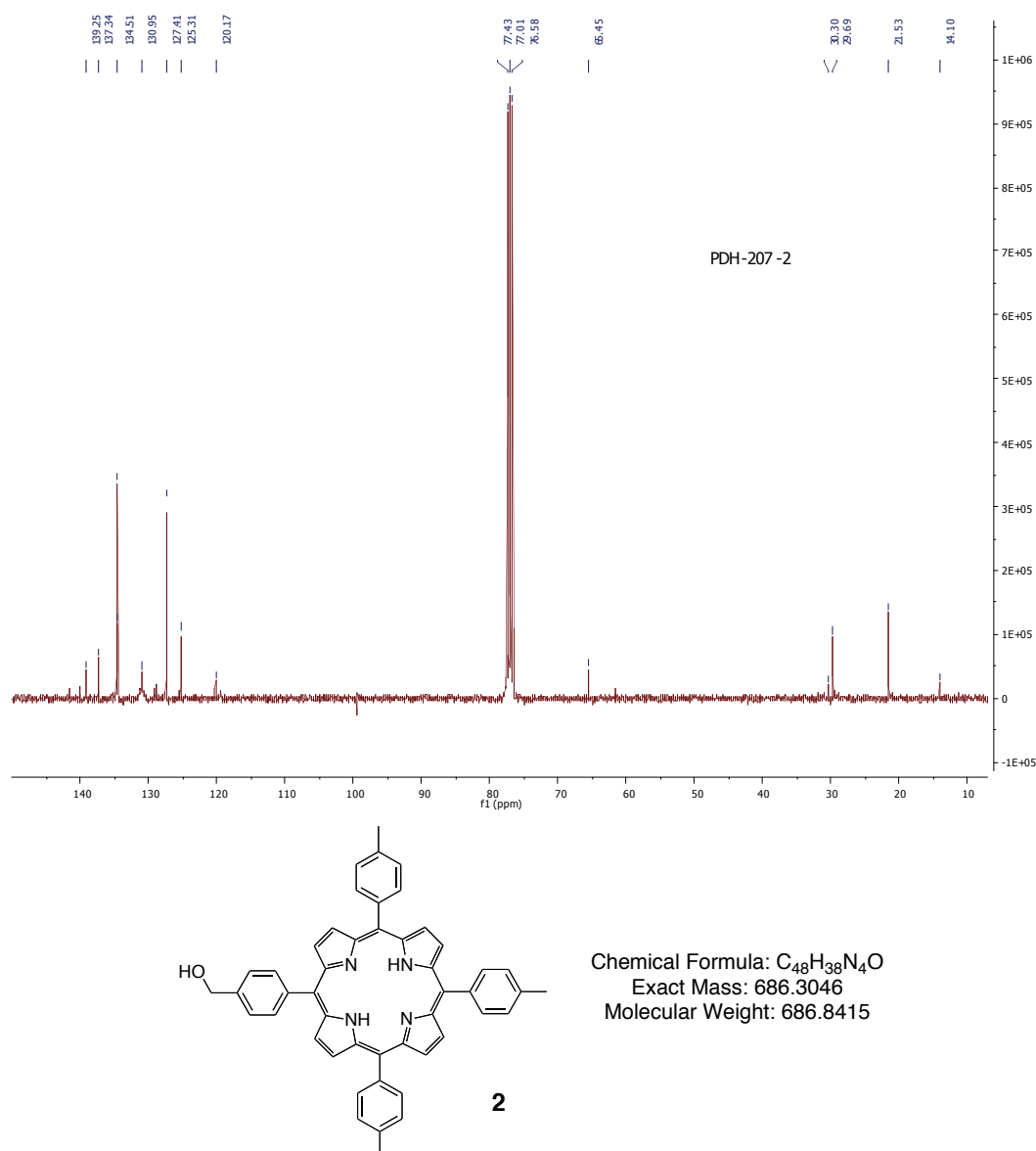
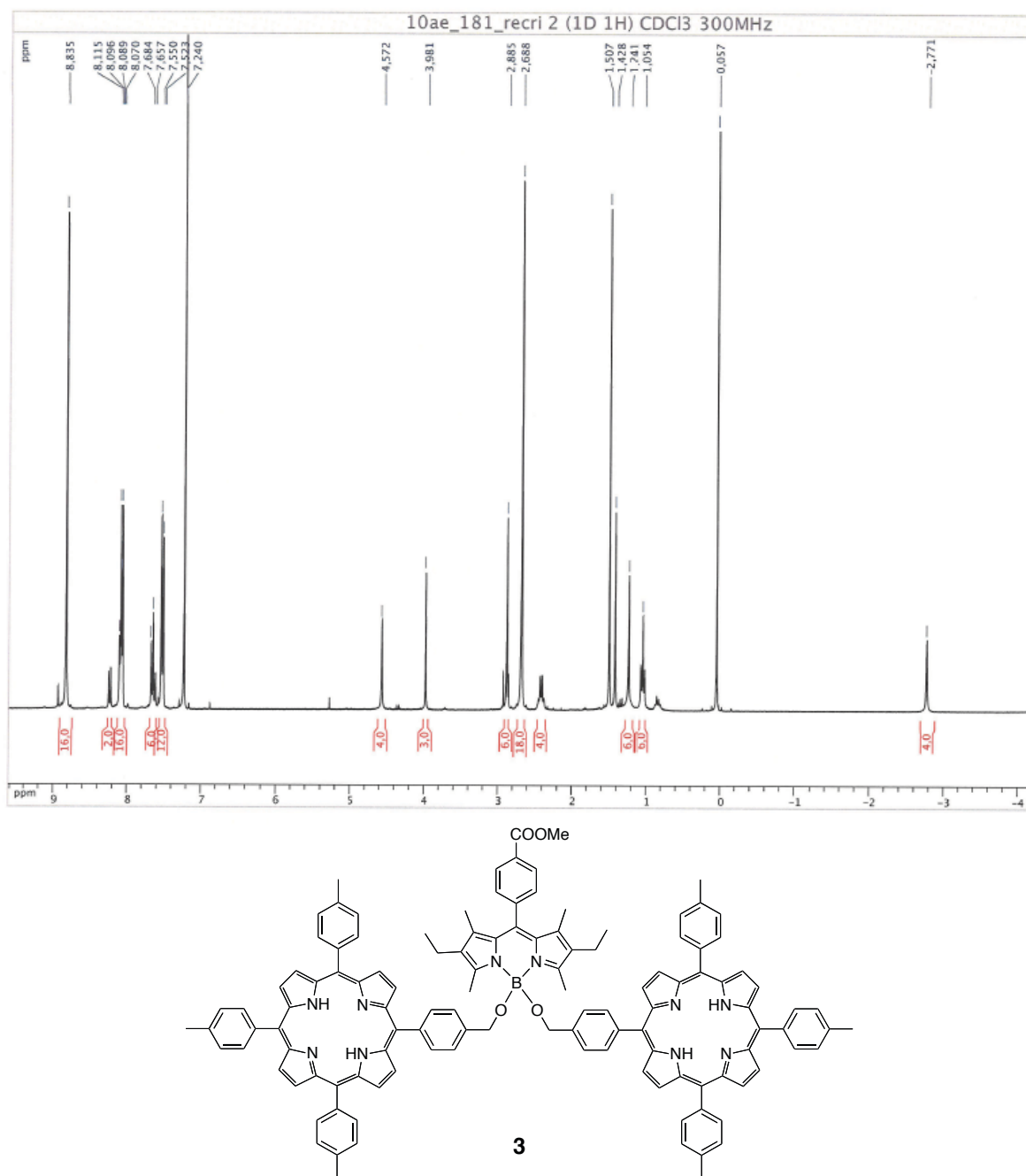


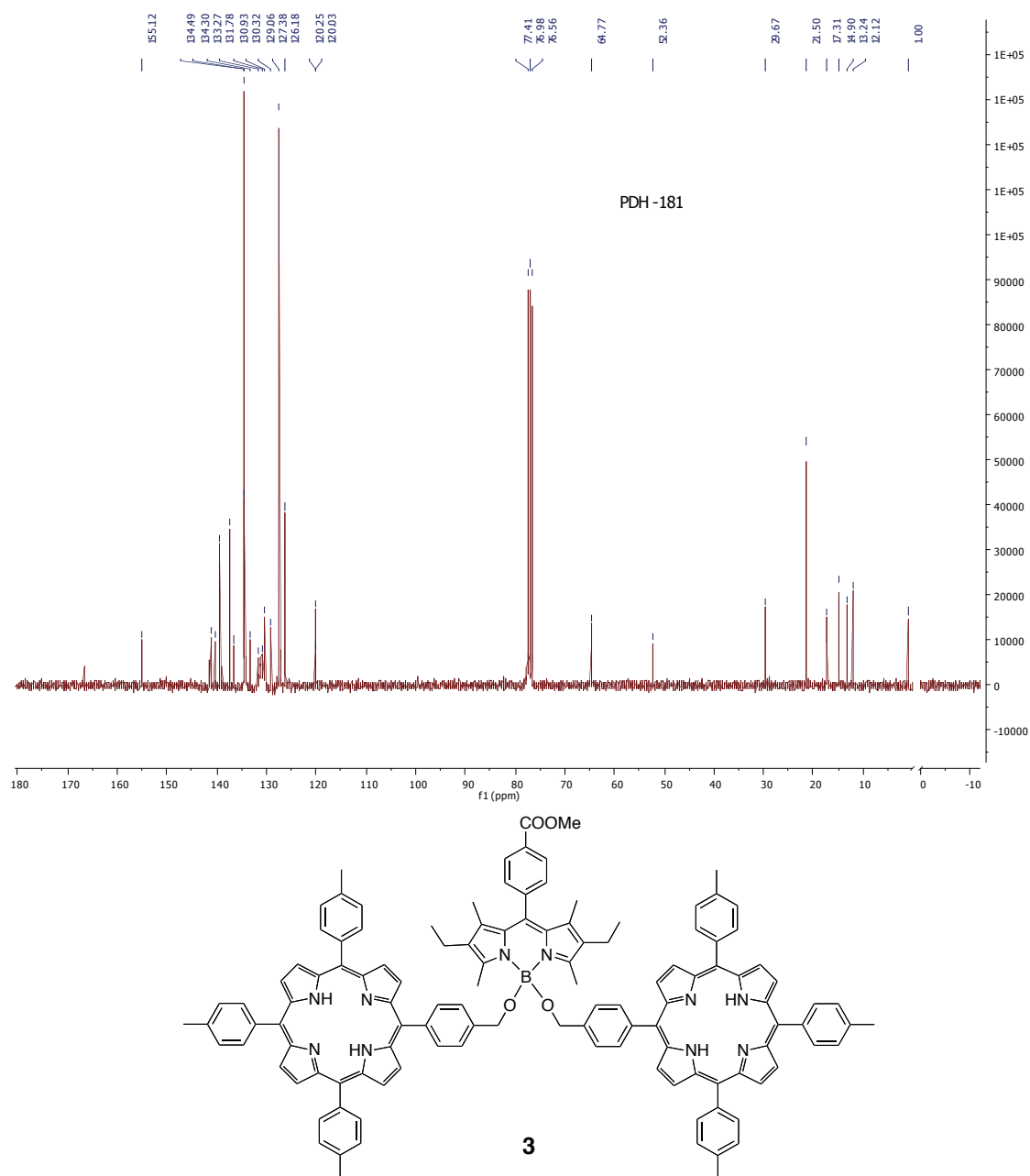
Figure S7: ^{13}C NMR (75 MHz, 298 K, CDCl_3) spectrum of **2**

Chemical Formula: C₁₂₁H₁₀₃BN₁₀O₄

Exact Mass: 1770.8257

Molecular Weight: 1771.9881

Figure S8: ¹H NMR (300 MHz, 298 K, CDCl₃) spectrum of **3**

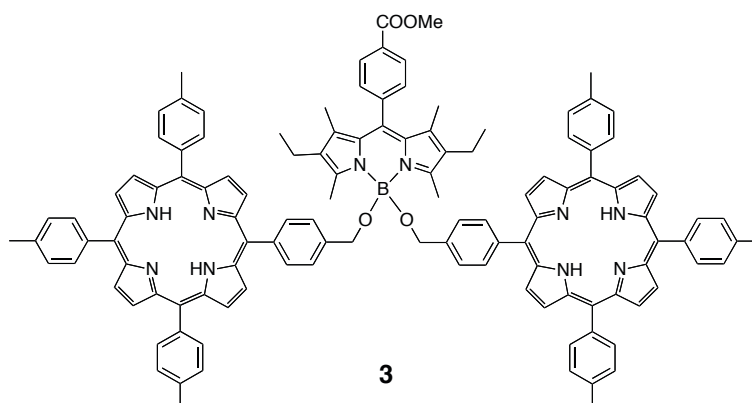
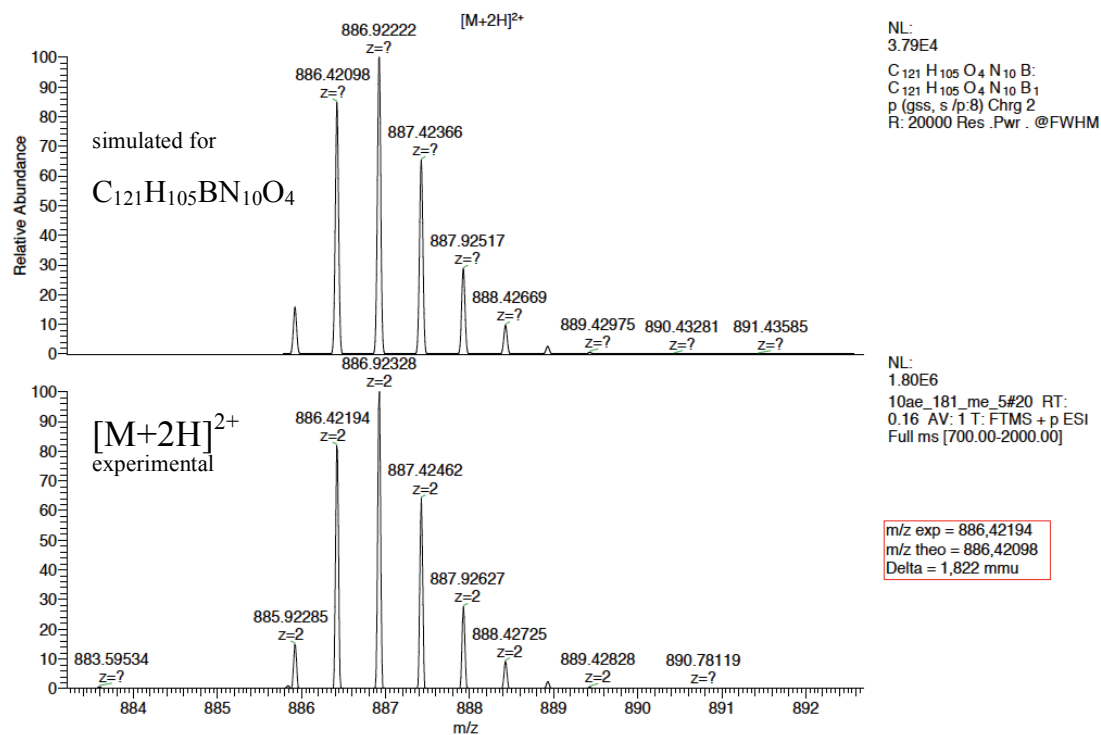


Chemical Formula: $C_{121}H_{103}BN_{10}O_4$

Exact Mass: 1770.8257

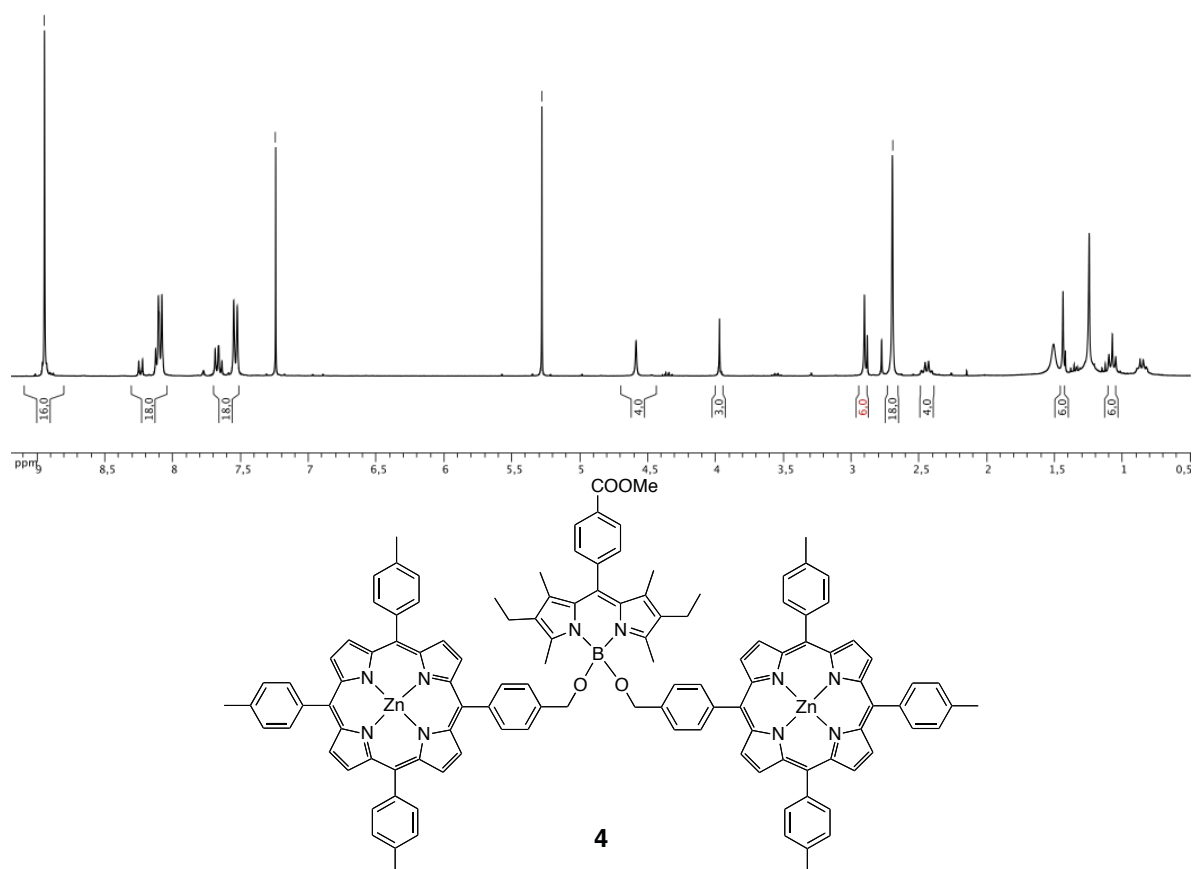
Molecular Weight: 1771.9881

Figure S9: ^{13}C NMR (75 MHz, 298 K, $CDCl_3$) spectrum of **3**



Chemical Formula: $C_{121}H_{103}BN_{10}O_4$
 Exact Mass: 1770.8257
 Molecular Weight: 1771.9881

Figure S10: HR-MS (ESI/orbitrap) mass spectrum of **3**

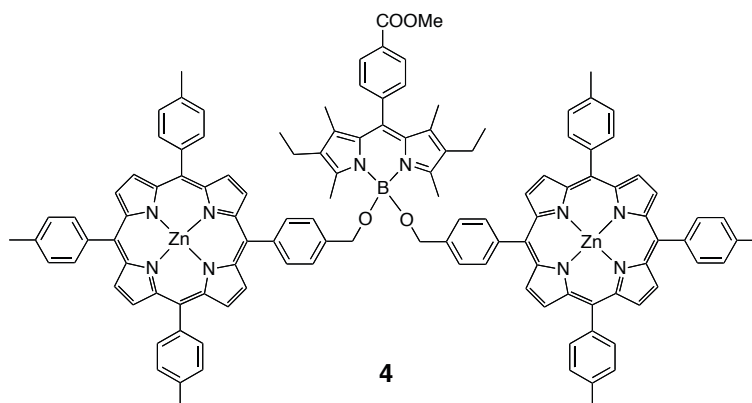
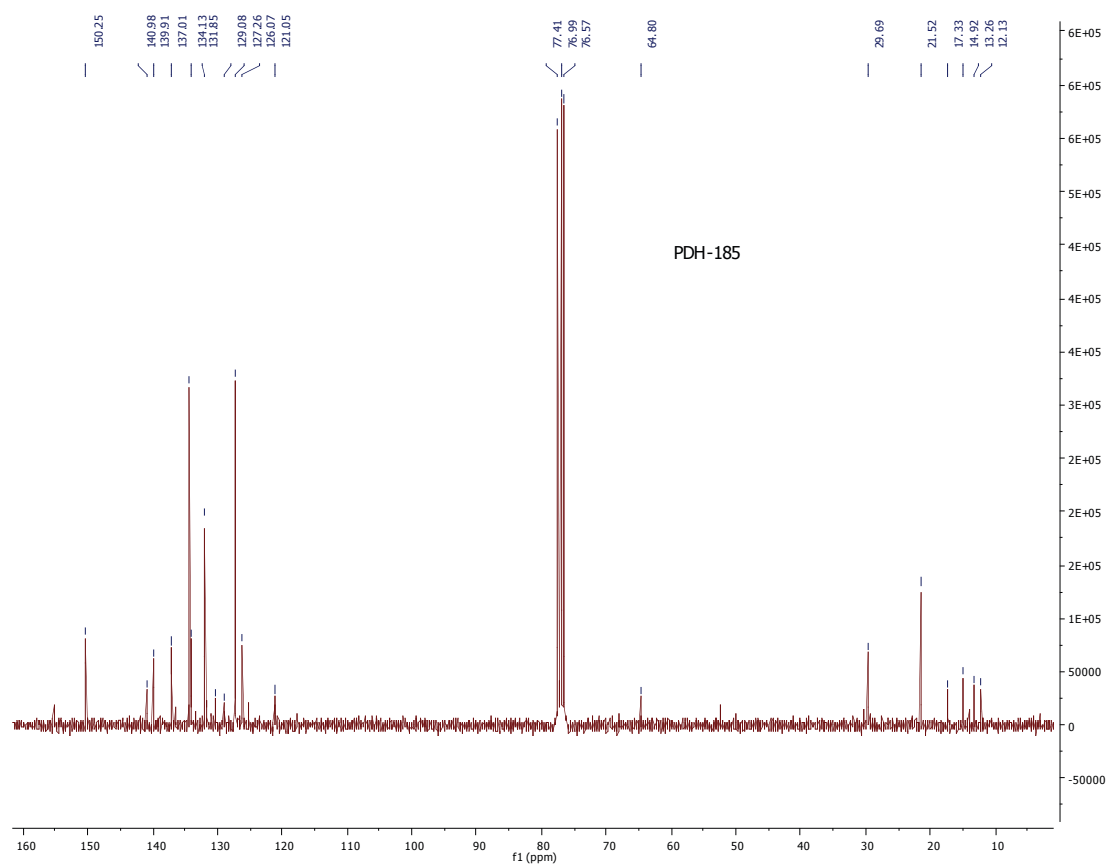


Chemical Formula: $\text{C}_{121}\text{H}_{103}\text{BN}_{10}\text{O}_4$

Exact Mass: 1770.8257

Molecular Weight: 1771.9881

Figure S11: ^1H NMR (300 MHz, 298 K, CDCl_3) spectrum of **4**



Chemical Formula: $C_{121}H_{103}BN_{10}O_4$

Exact Mass: 1770.8257

Molecular Weight: 1771.9881

Figure S12: ^{13}C NMR (75 MHz, 298 K, $CDCl_3$) spectrum of **4**

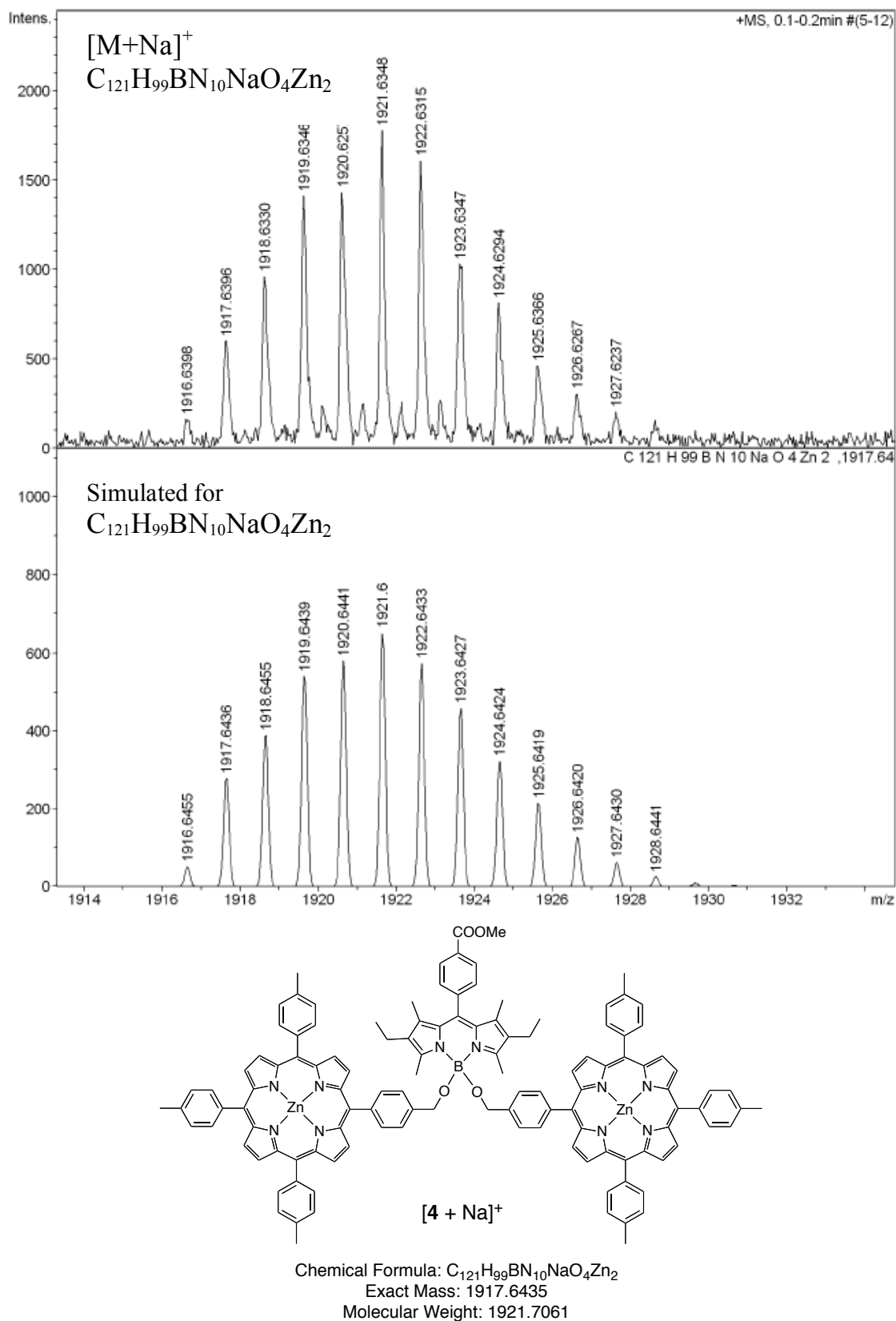


Figure S13: Experimental and calculated HR-MS (ESI-QTOF) mass spectrum of 4

Photophysical spectra

Absorption spectra

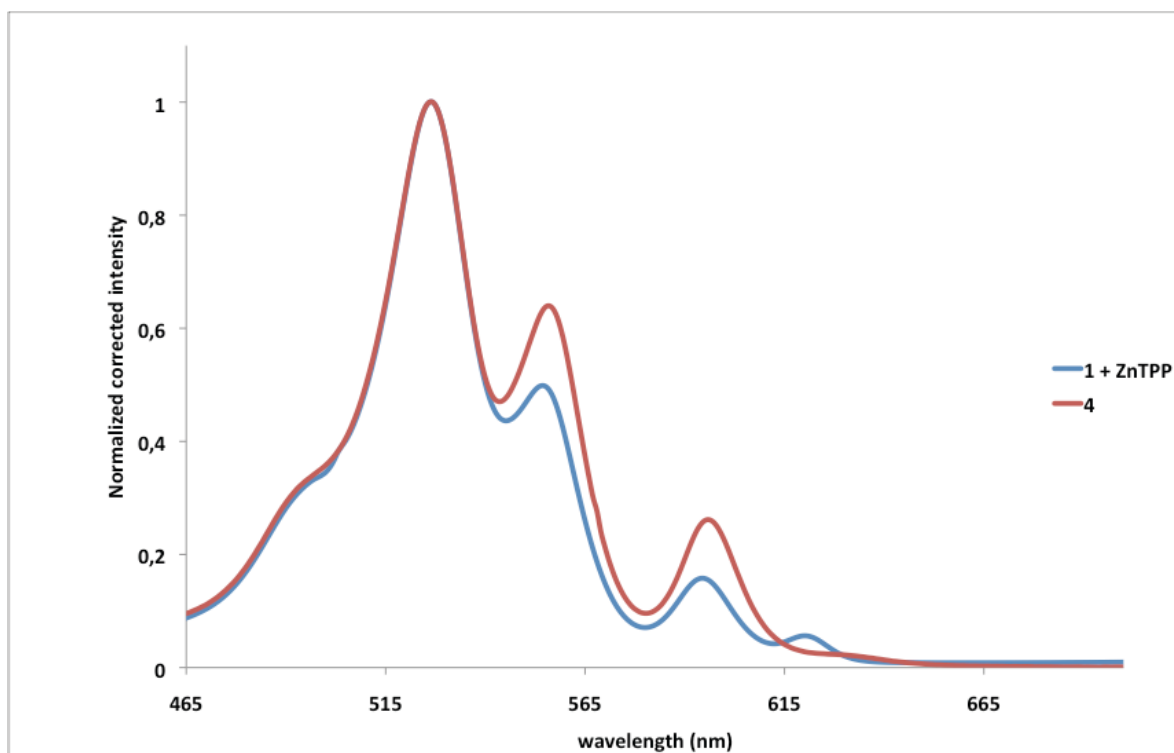


Figure S14: Absorption spectra of compounds **1** + ZnTPP (blue) and compound **4** (red) in 2-MeTHF, at 298K.

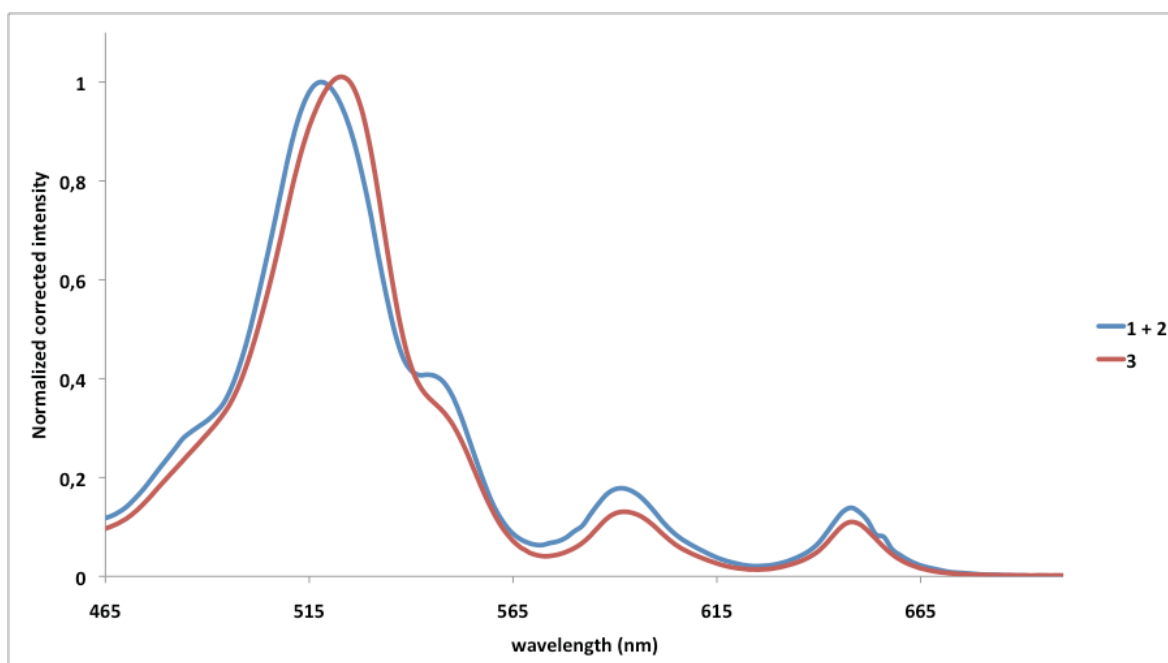


Figure S15: Absorption spectra of compounds **1 + 2** (blue) and compound **3** (red) in 2-MeTHF, at 298K.

Emission spectra

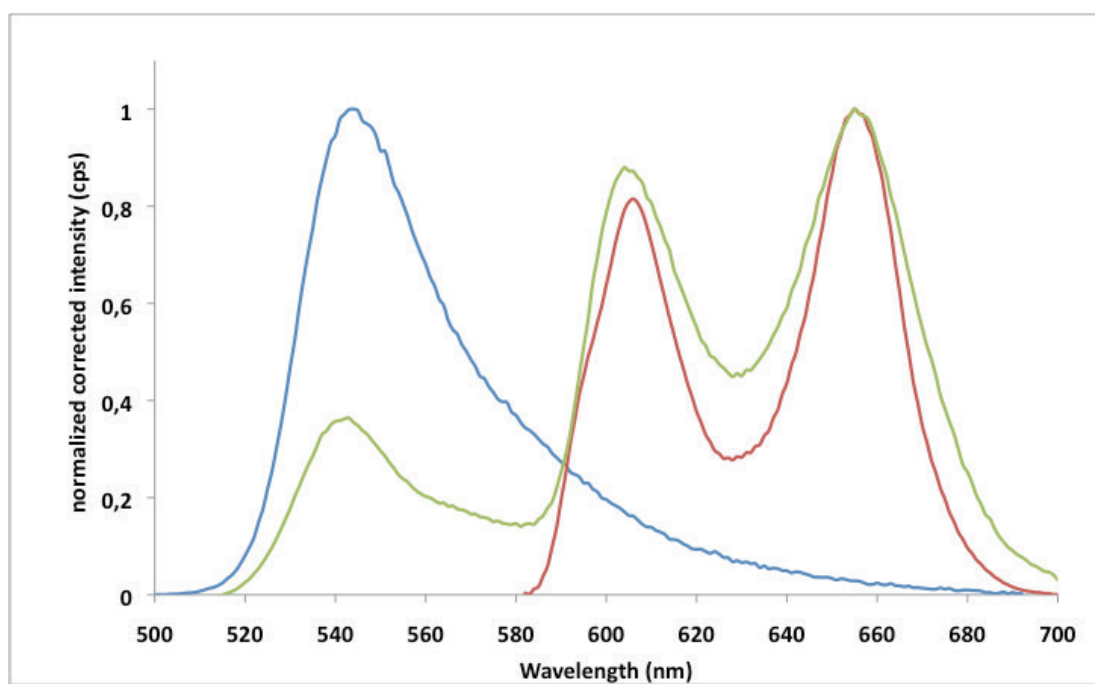


Figure S16: Emission spectra of compounds **4** (green), **1** (blue, $\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm), and ZnTPP (red, $\lambda_{\text{exc}} = 530$ nm) in 2-MeTHF, at 298K.

Annexe 5 : "Supporting Information" de l'article IV

Slow and fast singlet energy transfers in BODIPY-gallium(III)corrole dyads linked by flexible chains

Bertrand Brizet, Nicolas Desbois, Antoine Bonnot, Adam Langlois, Adrien Dubois, Jean-Michel Barbe, Claude P. Gros,* Christine Goze,* Franck Denat and Pierre D. Harvey*

Figure S1: Absorbance spectra and picture of solutions containing compounds 2 , 7 and 3 illustrating the real colors of red, green and blue-BODIPY.	344
Figure S2: Fluorescence spectra of solutions containing compounds 2 , 7 and 3 .	345
Figure S3: ¹ H NMR spectra of 1 in CDCl ₃	347
Figure S4: MALDI/TOF mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 1	347
Figure S5: Photophysical spectra of 1 in 2-MeTHF	348
Figure S6: ¹ H NMR spectrum of 2 in CDCl ₃	348
Figure S7: ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 2	349
Figure S8: Photophysical spectra of 2 in 2-MeTHF	350
Figure S9: ¹ H NMR spectrum of 3 in CDCl ₃	350
Figure S10: HRMS (ESI) mass spectra of 3	351
Figure S11: Photophysical spectra of 3 in 2-MeTHF	352
Figure S12: ¹ H NMR spectrum of 4 in pyridine D ₅	352
Figure S13: MALDI/TOF mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 4	353
Figure S14: Photophysical spectra of 4 in 2-MeTHF	354
Figure S15: ¹ H NMR spectrum of 5 in pyridine D ₅	354
Figure S16: MALDI/TOF mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 5	355
Figure S17: Photophysical spectra of 5 in 2-MeTHF	357
Figure S18: ¹ H NMR spectrum of 6 in CDCl ₃	355
Figure S19: HRMS (ESI) mass spectra of 6	357
Figure S20: Photophysical spectra of 6 in 2-MeTHF	358
Figure S21: ¹ H NMR spectrum of 7 in CDCl ₃	358
Figure S22: HRMS (ESI) mass spectra of 7	359
Figure S23: Photophysical spectra of 7 in MeTHF	360
Figure S24: ¹ H NMR spectrum of 8 in pyridine D ₅	360
Figure S25: MALDI/TOF mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 8	361
Figure S26: Photophysical spectra of 8 in 2-MeTHF	362
Figure S27: ¹ H NMR spectrum of 9 in pyridine D ₅	362
Figure S28: MALDI/TOF mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of 9	363
Figure S29: Photophysical spectra of 9 in 2-MeTHF	364

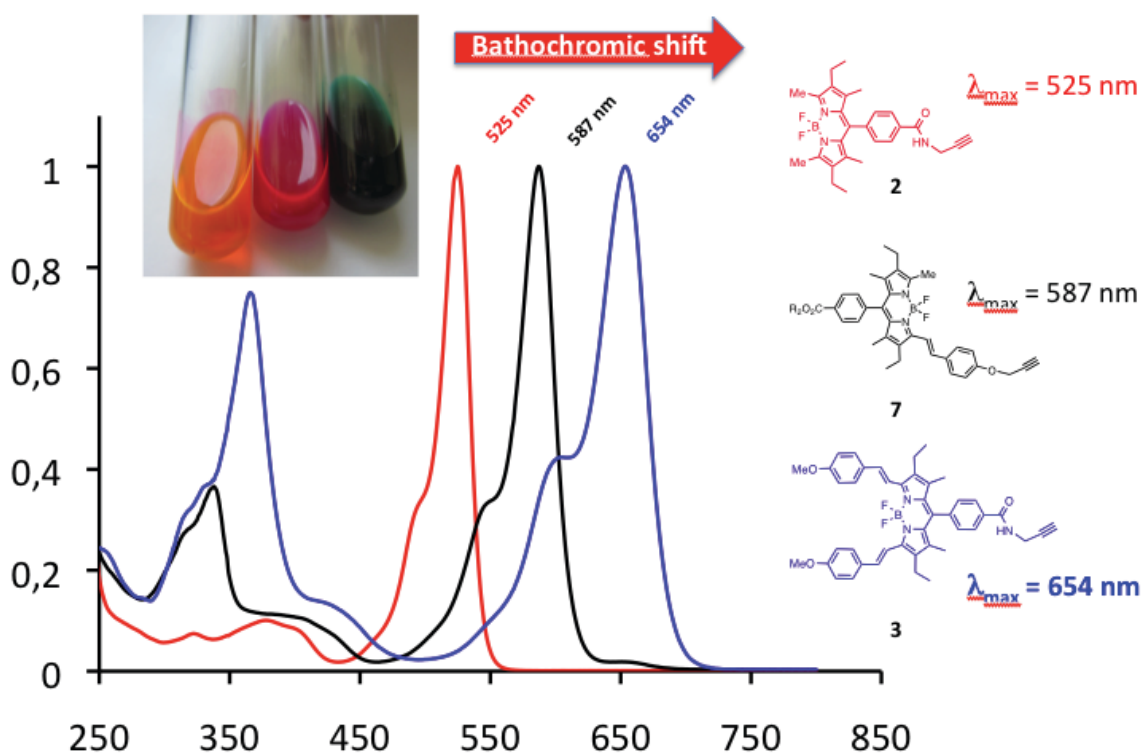


Figure S1: Absorbance spectra (in 2-MeTHF) and picture of solutions containing compounds **2**, **7** and **3** illustrating the real colors of red, green and blue-BODIPY.

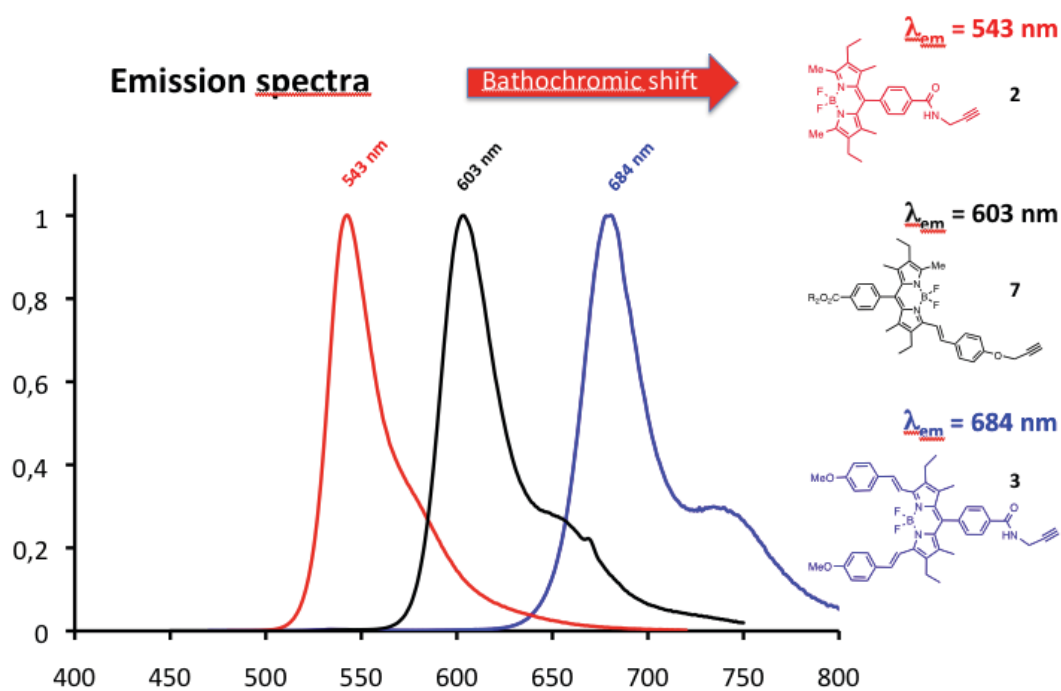


Figure S2: Fluorescence spectra (in 2-MeTHF) of solutions containing compounds **2**, **7** and **3**.

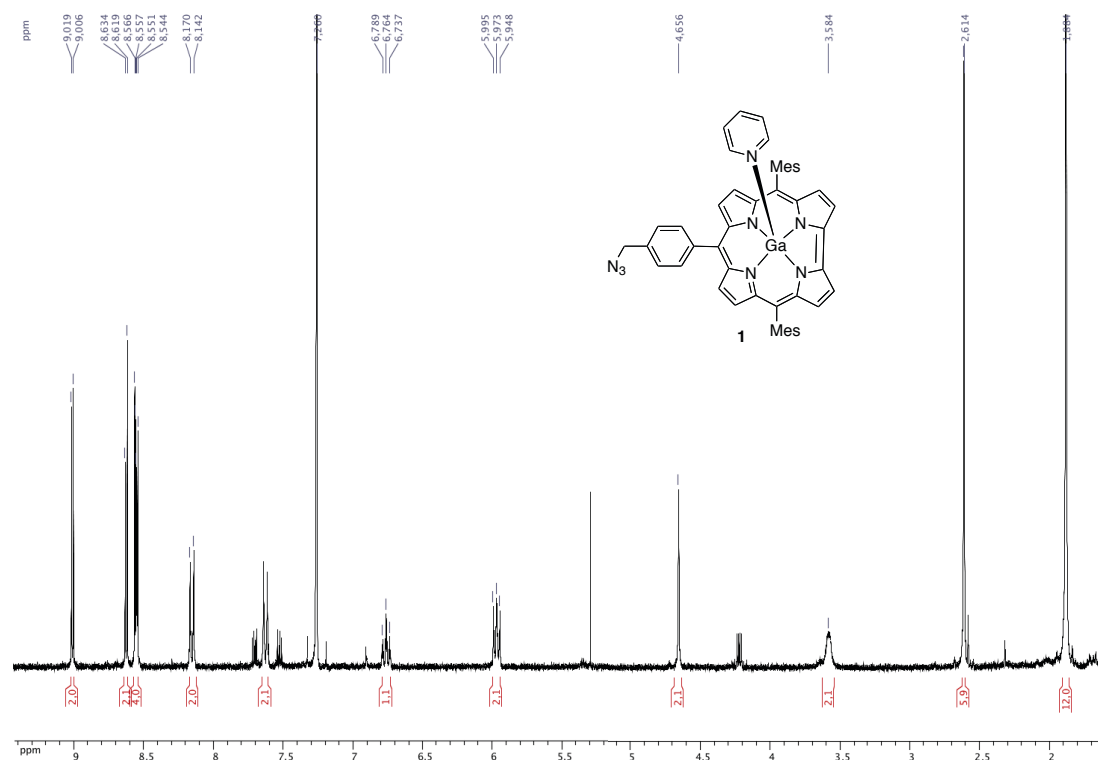
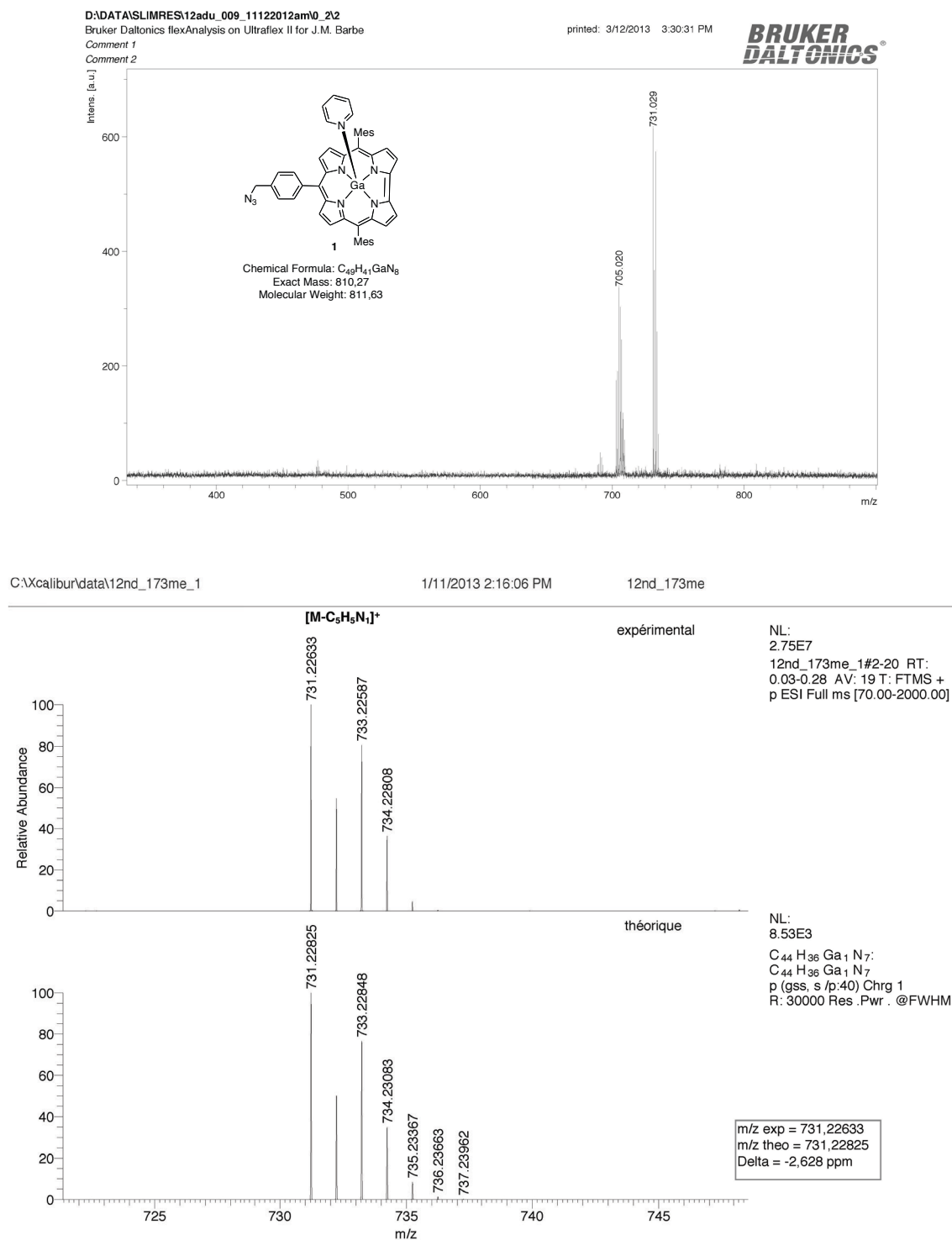


Figure S3. ^1H NMR spectra of **1** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K)

Figure S4. MALDI/TOF mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **1**.

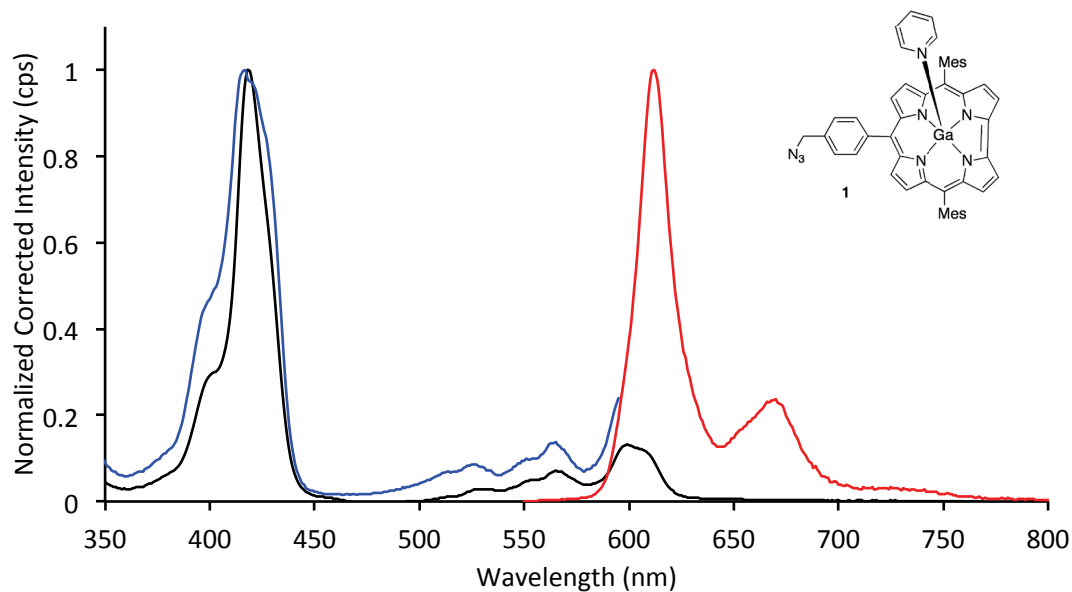


Figure S5. Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 540$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 650$ nm) spectra of **1** in 2-MeTHF at room temperature.

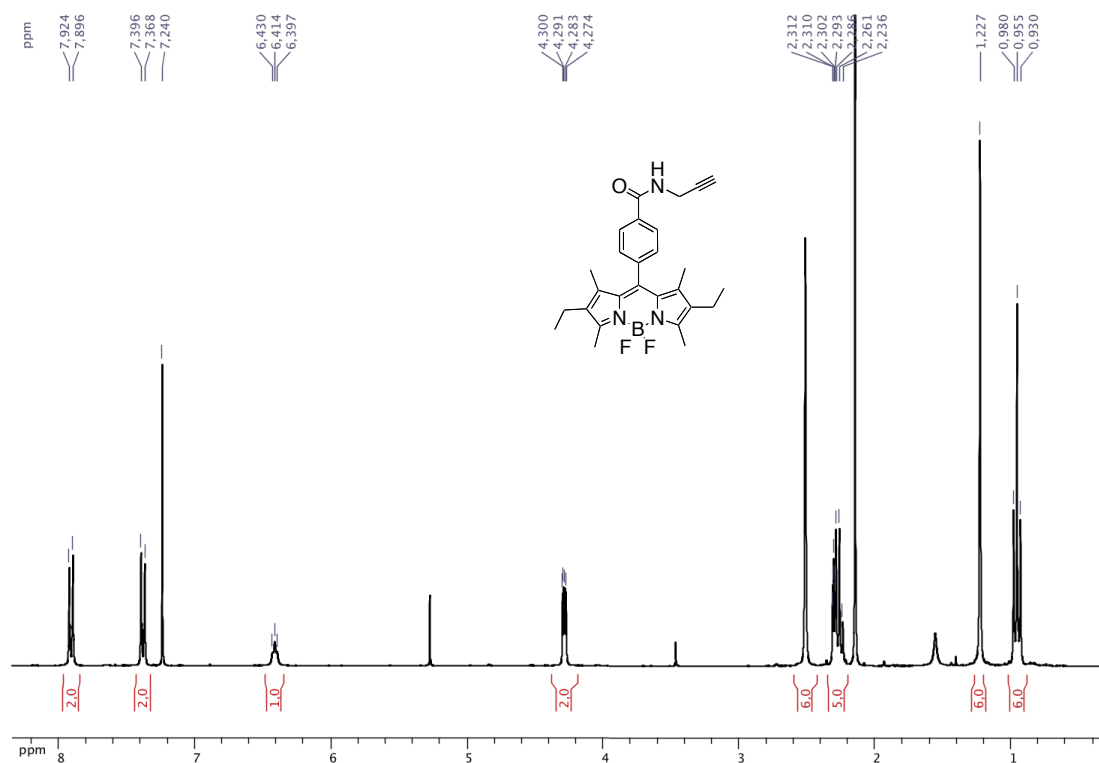
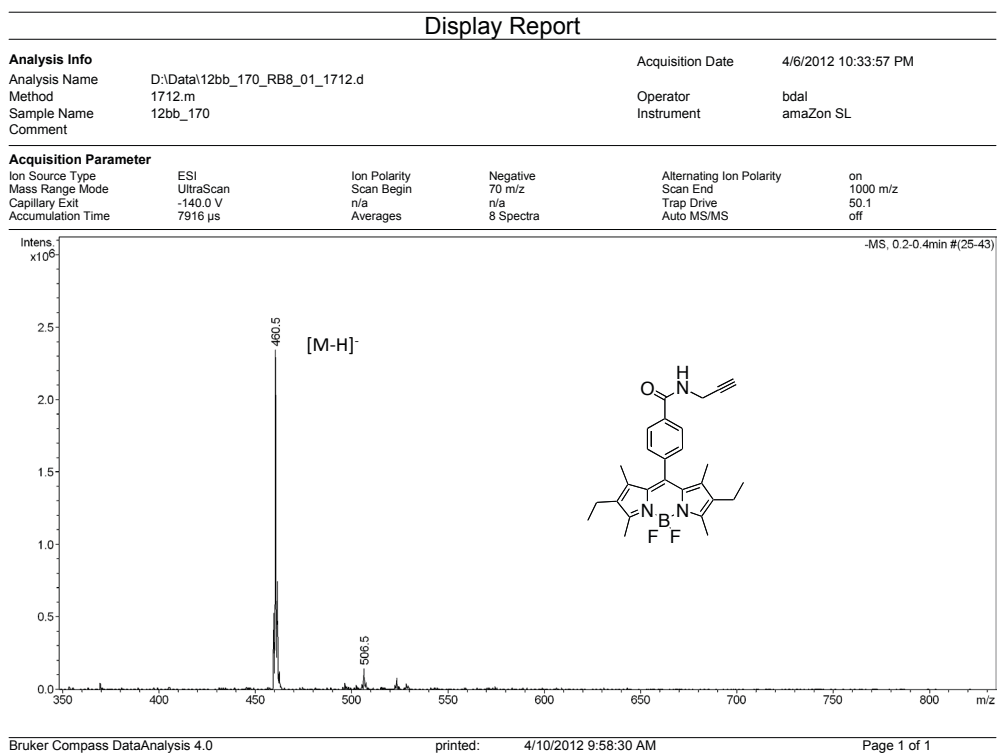


Figure S6. ^1H NMR spectrum of **2** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K)



C:\Xcalibur\data\13bb_29_me_1

7/12/2013 2:55:14 PM

13bb_29_me

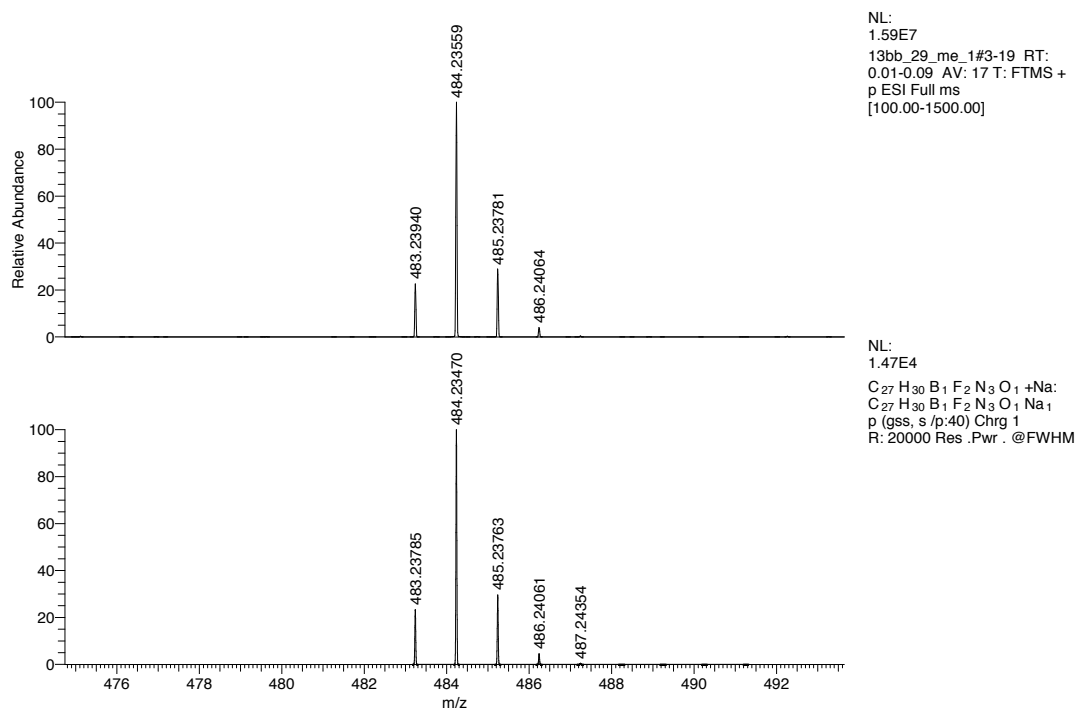


Figure S7. ESI mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **2**
 (up = experimental, down = theoretical)

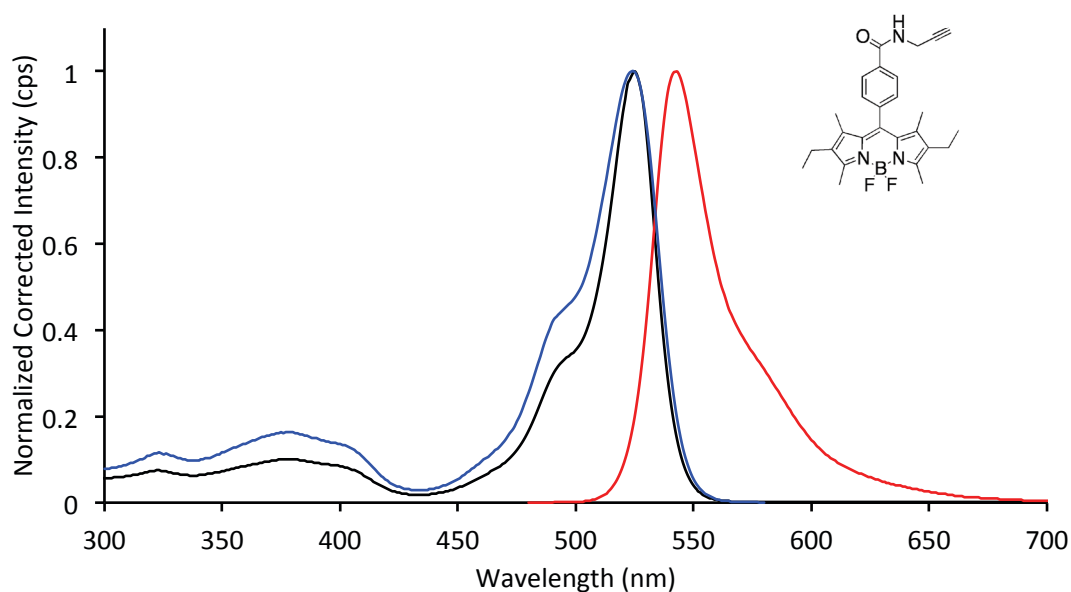


Figure S8. Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) spectra of **2** in 2-MeTHF at room temperature.

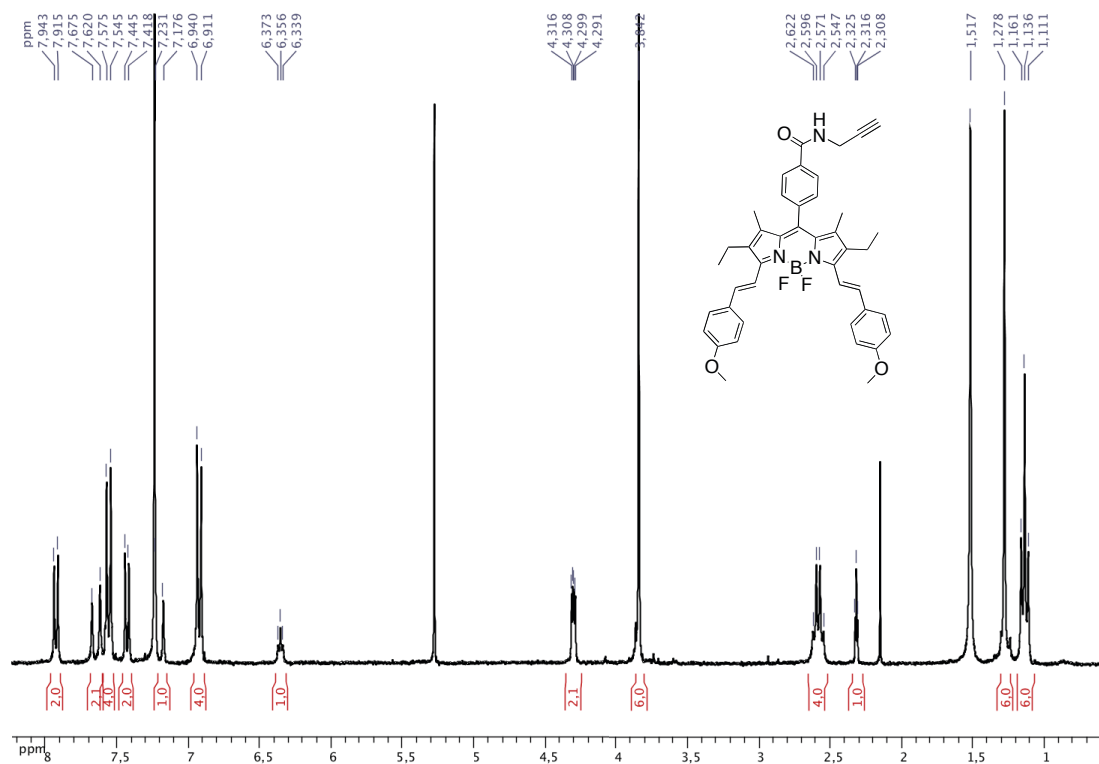


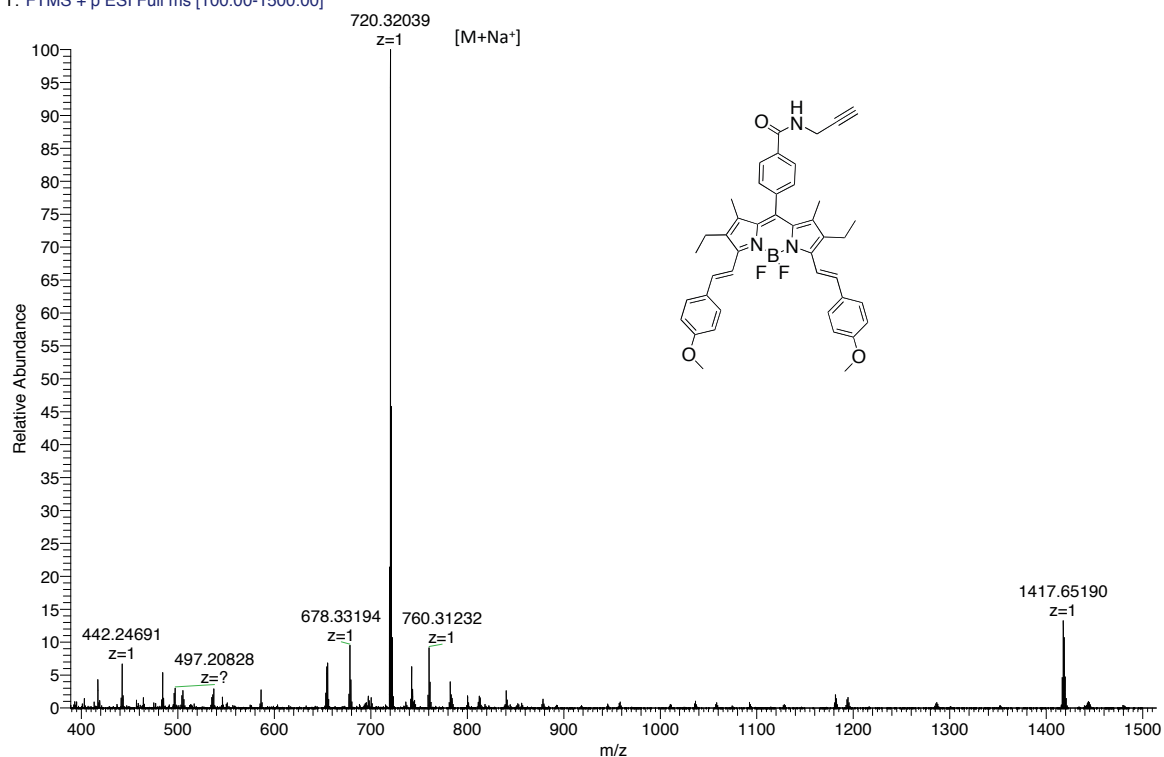
Figure S9. ^1H NMR spectrum of **3** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K)

C:\Xcalibur\data\13bb_30_me_1

7/12/2013 2:56:56 PM

13bb_30_me

13bb_30_me_1 #2-20 RT: 0.01-0.11 AV: 19 NL: 5.01E6
 T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-1500.00]



C:\Xcalibur\data\13bb_30_me_1

7/12/2013 2:56:56 PM

13bb_30_me

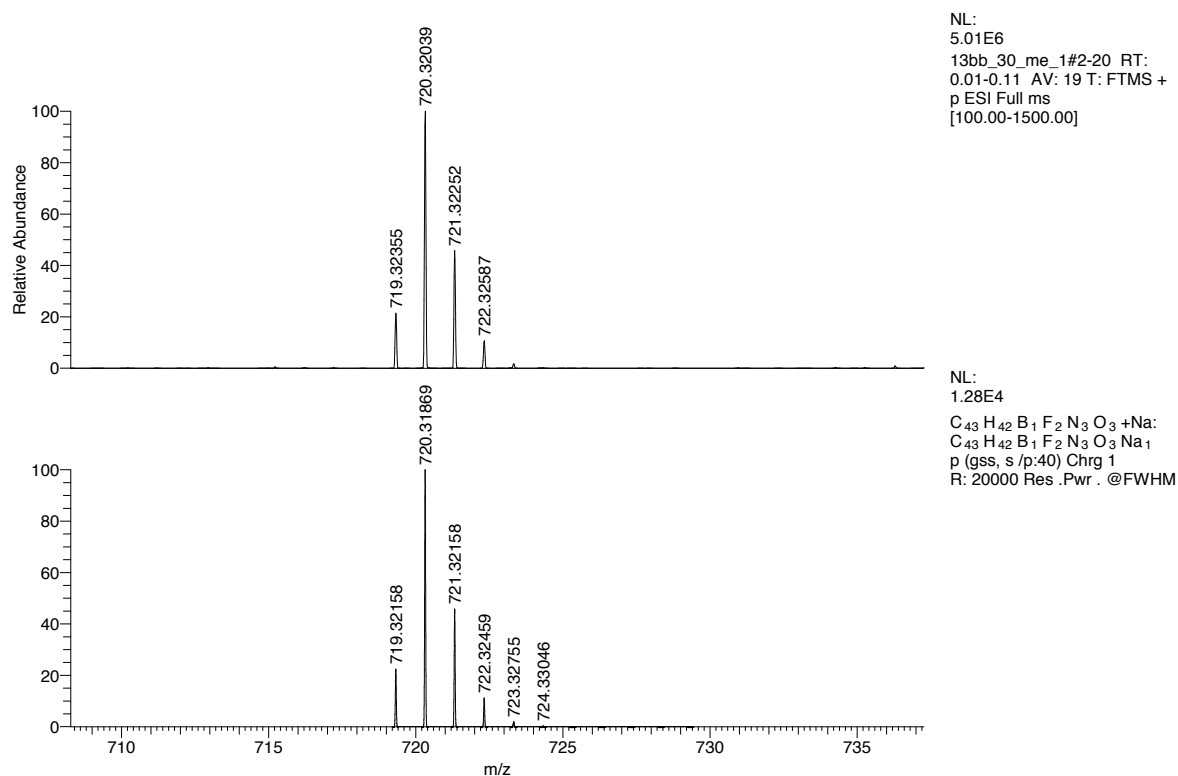


Figure S10. HRMS (ESI) mass spectra of **3** (up = experimental, down = theoretical)

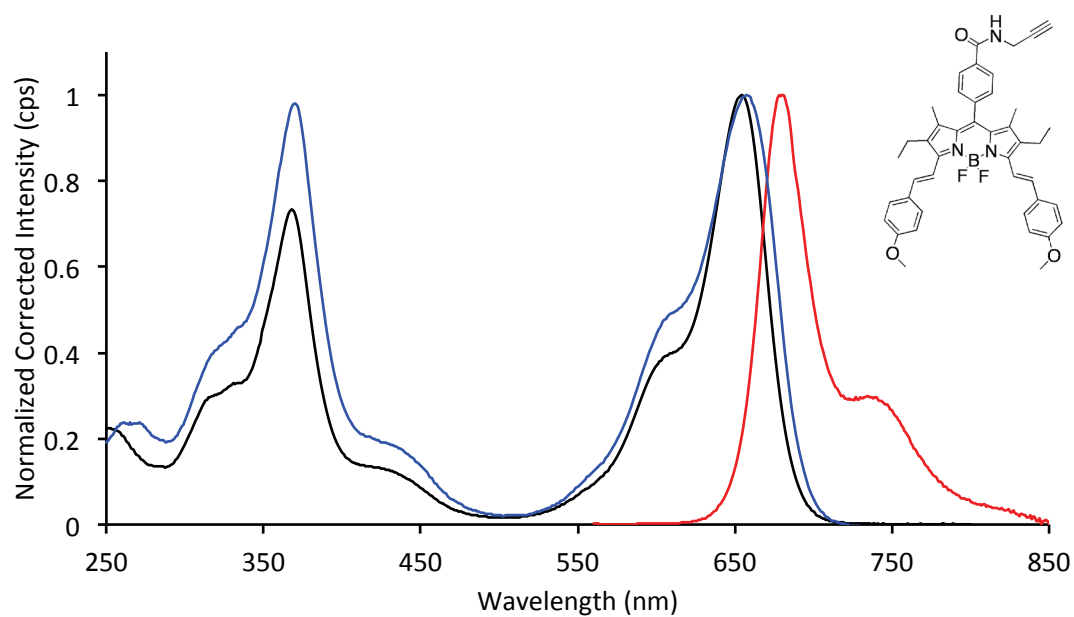
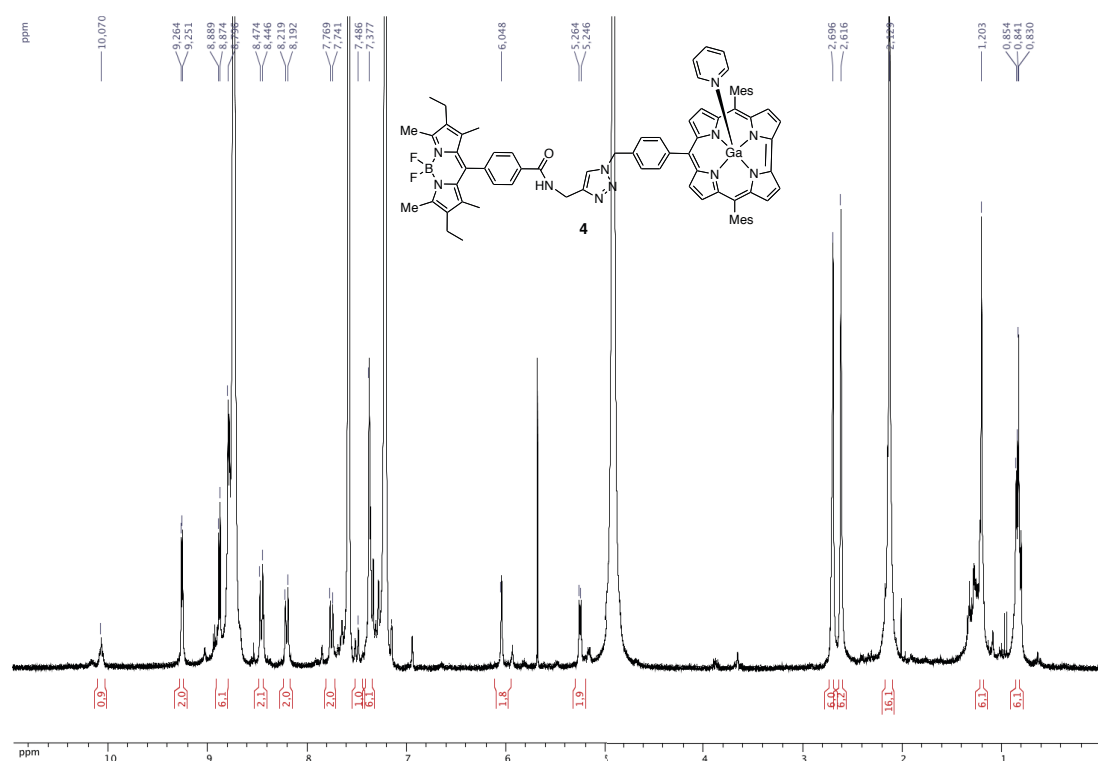
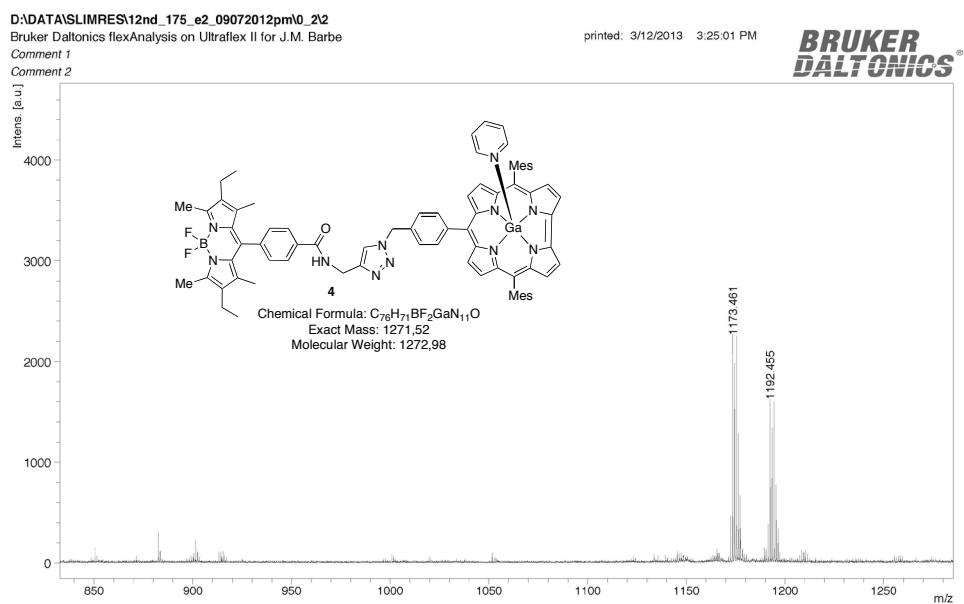


Figure S11. Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 750$ nm) spectra of **3** in 2-MeTHF at room temperature.

Figure S12. ¹H NMR spectrum of 4 (pyridine D₅, 300 MHz, 298 K)

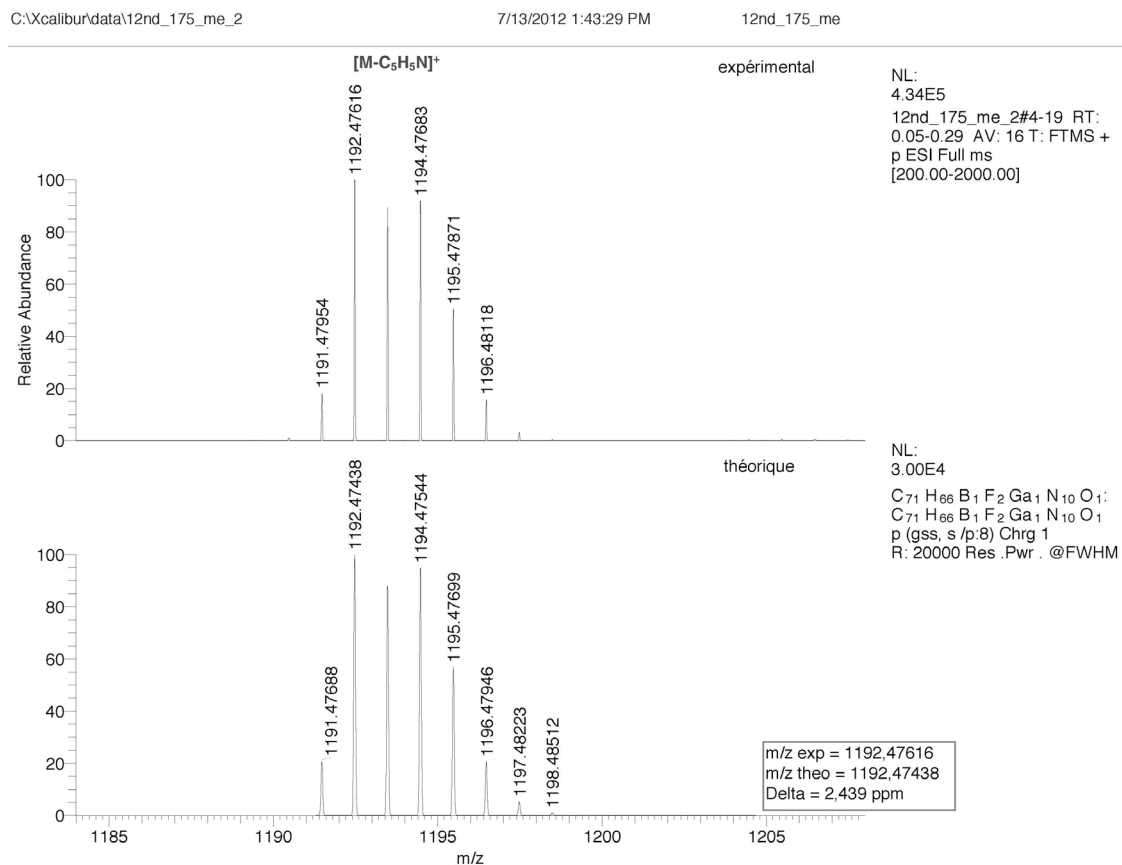


Figure S13. MALDI/TOF mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **4**.

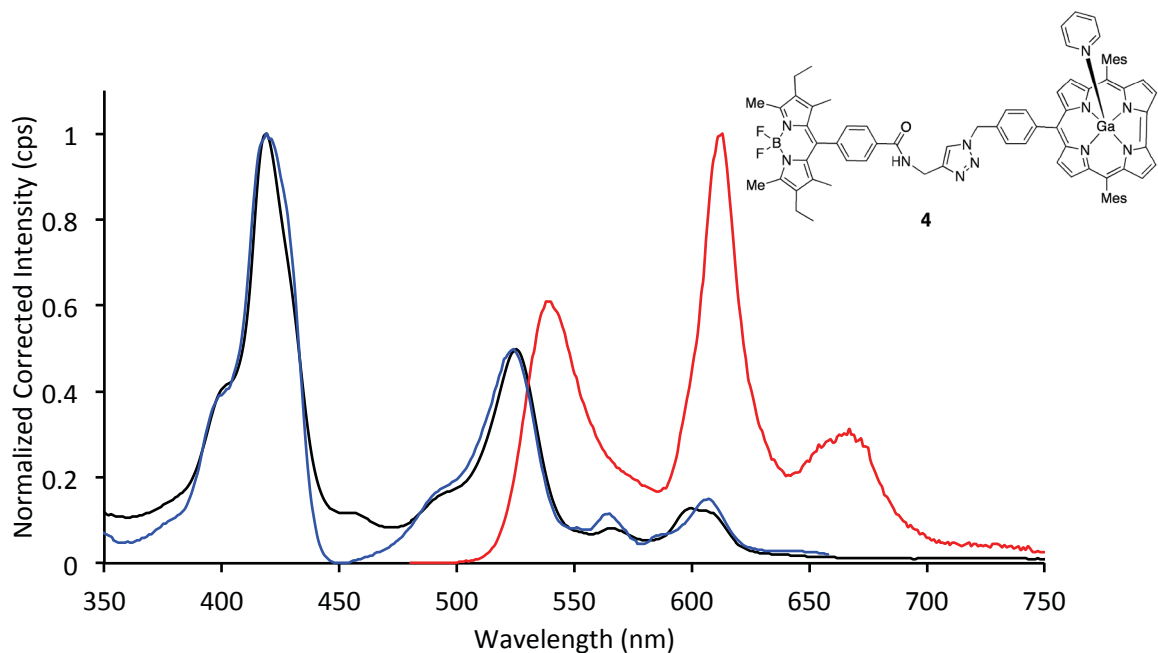
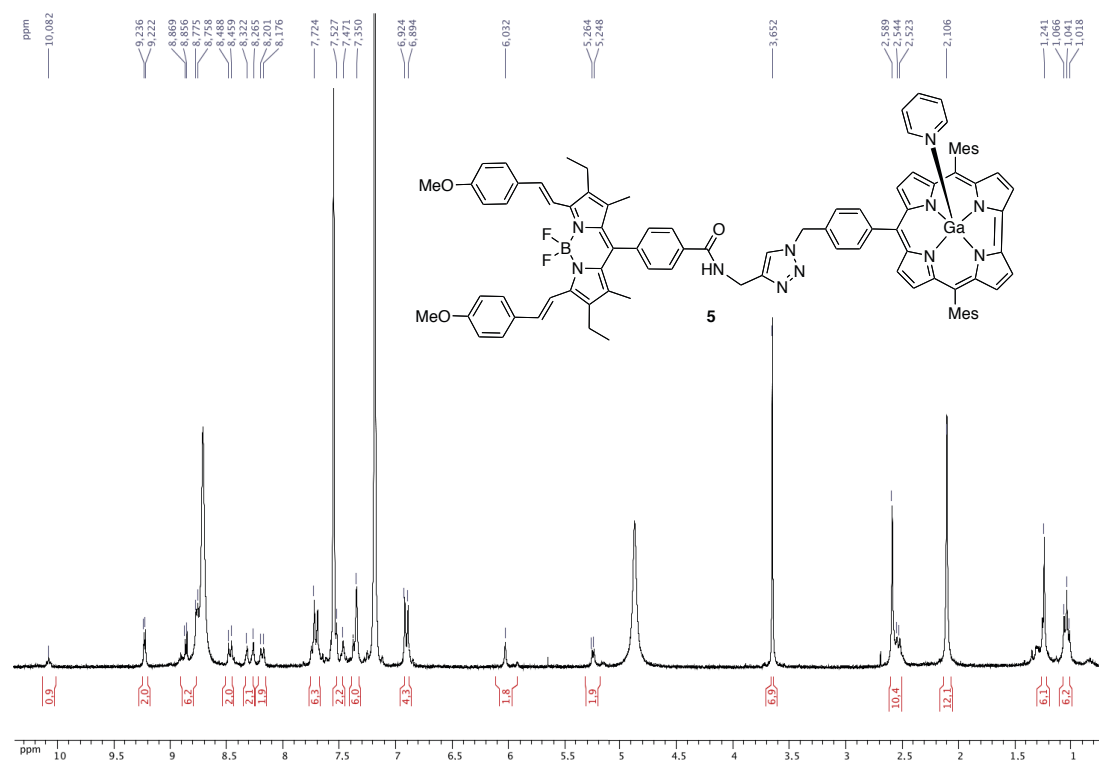
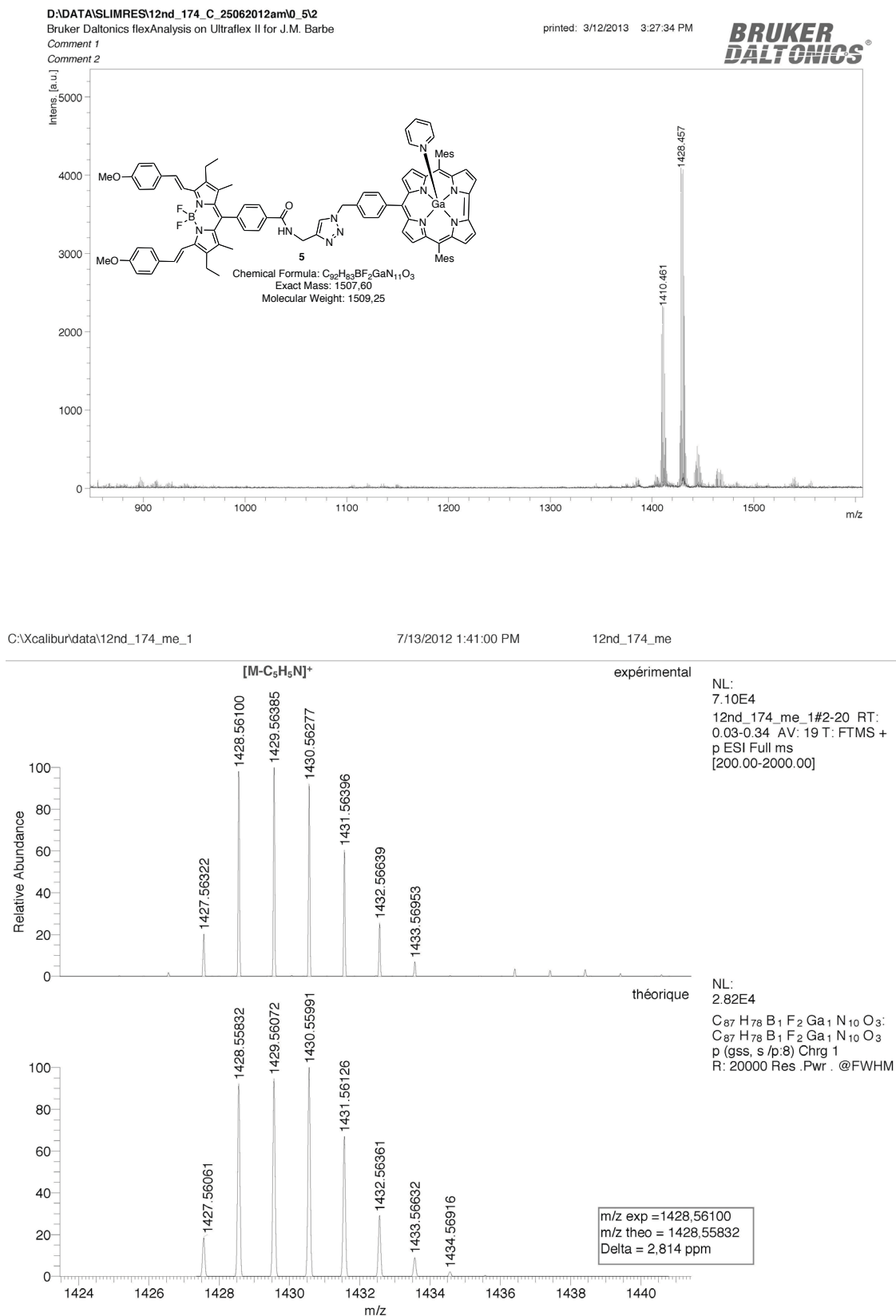


Figure S14. Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 670$ nm) spectra of **4** in 2-MeTHF at room temperature.

Figure S15. ^1H NMR spectrum of **5** (pyridine D_5 , 300 MHz, 298 K)

Figure S16. MALDI/TOF mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **5**

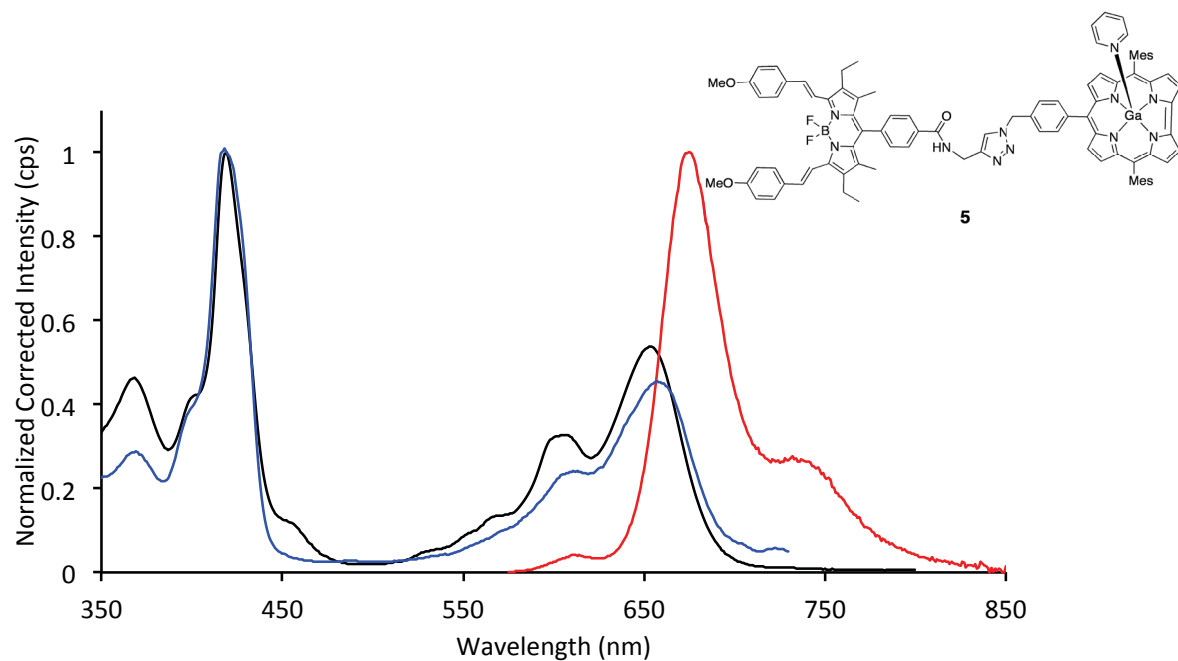


Figure S17. Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 740$ nm) spectra of **5** in 2-MeTHF at room temperature.

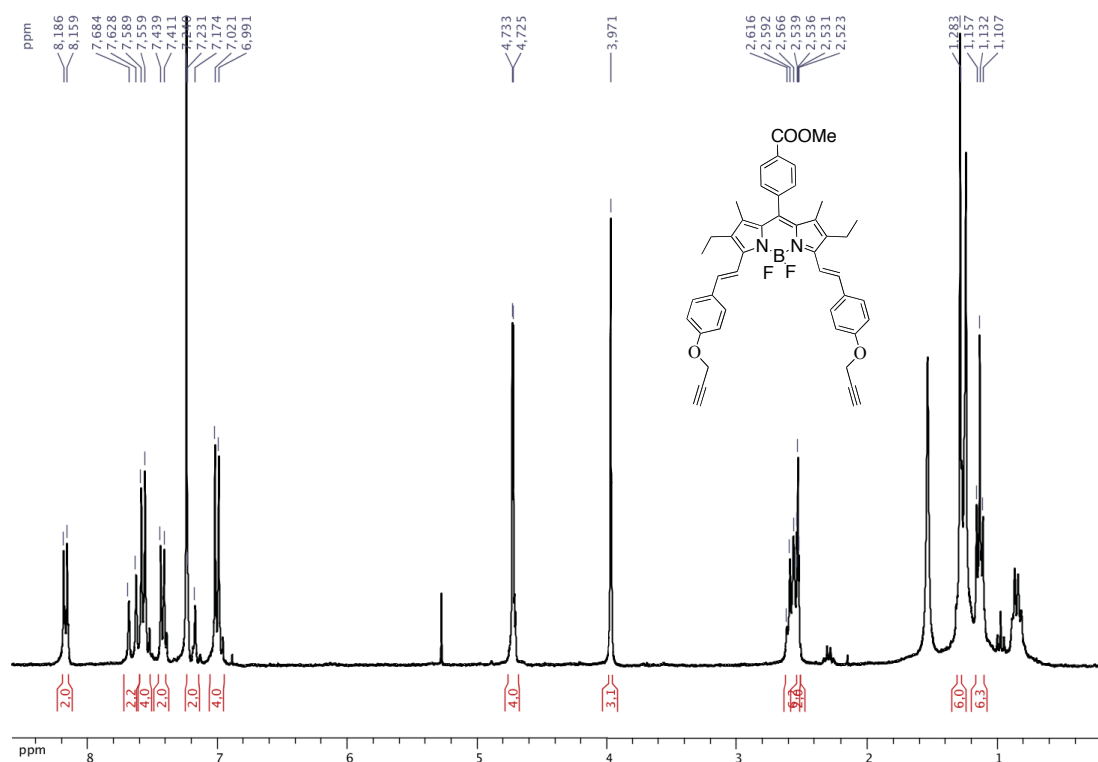


Figure S18. ^1H NMR spectrum of **6** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K)



357

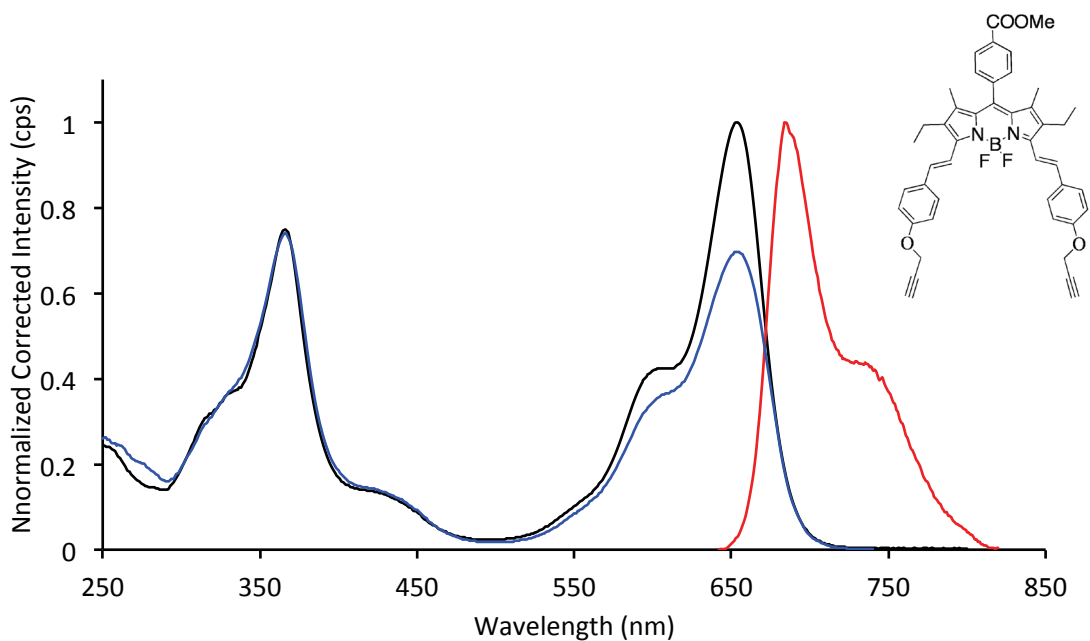


Figure S20. Absorption (black), fluorescence (red, λ_{ex} = 510 nm) and excitation (blue, λ_{em} = 750 nm) spectra of **6** in 2-MeTHF at room temperature.

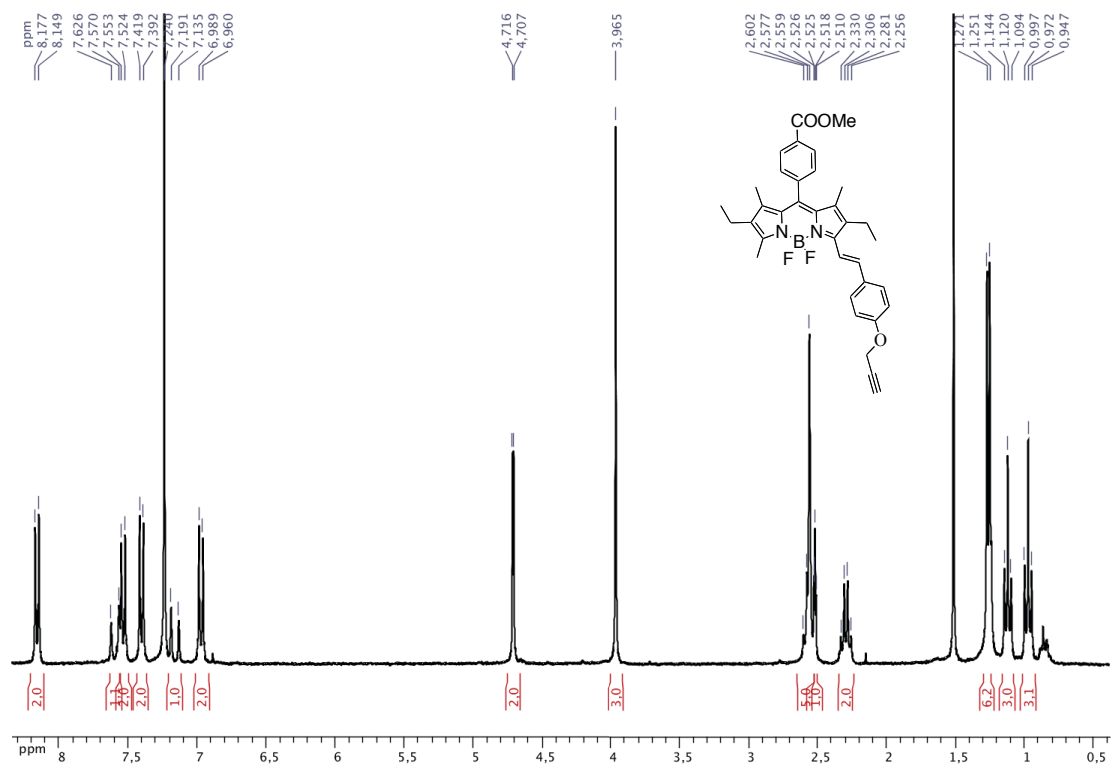


Figure S21. ^1H NMR spectrum of **7** (CDCl_3 , 300 MHz, 298 K)

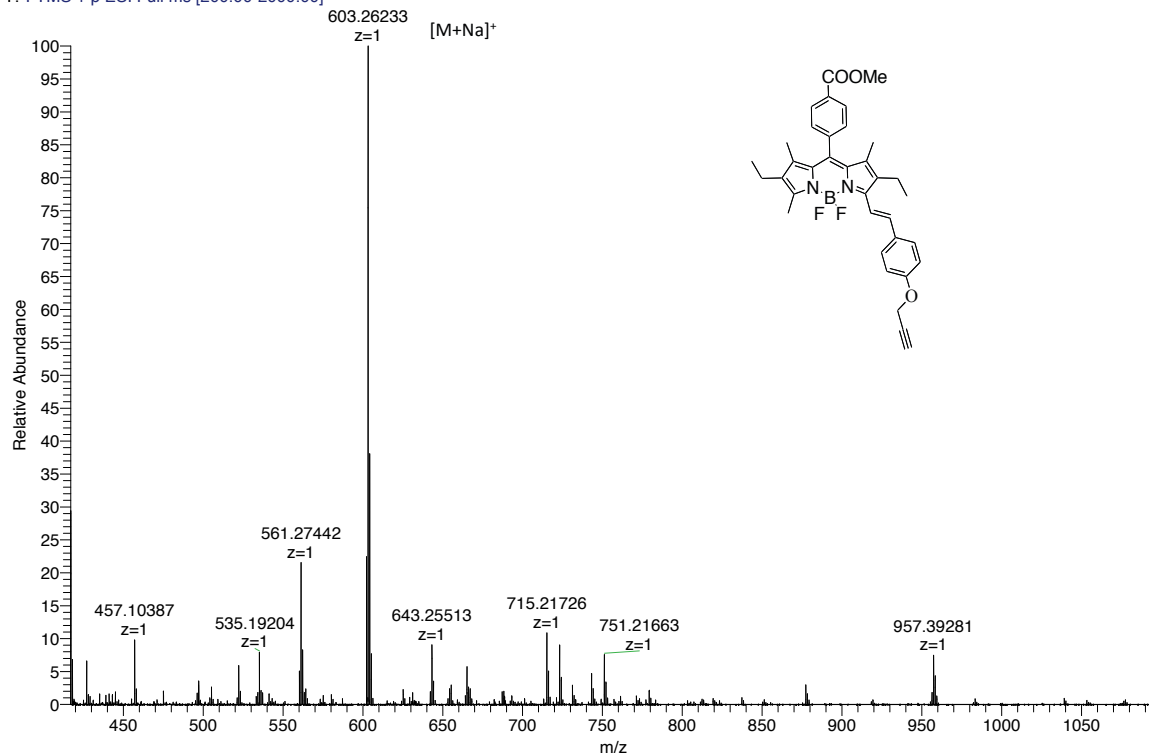
C:\Xcalibur\data\13bb_24_me_1

7/12/2013 2:50:58 PM

13bb_24_me

13bb_24_me_1 #221-227 RT: 1.57-1.61 AV: 7 NL: 4.00E6

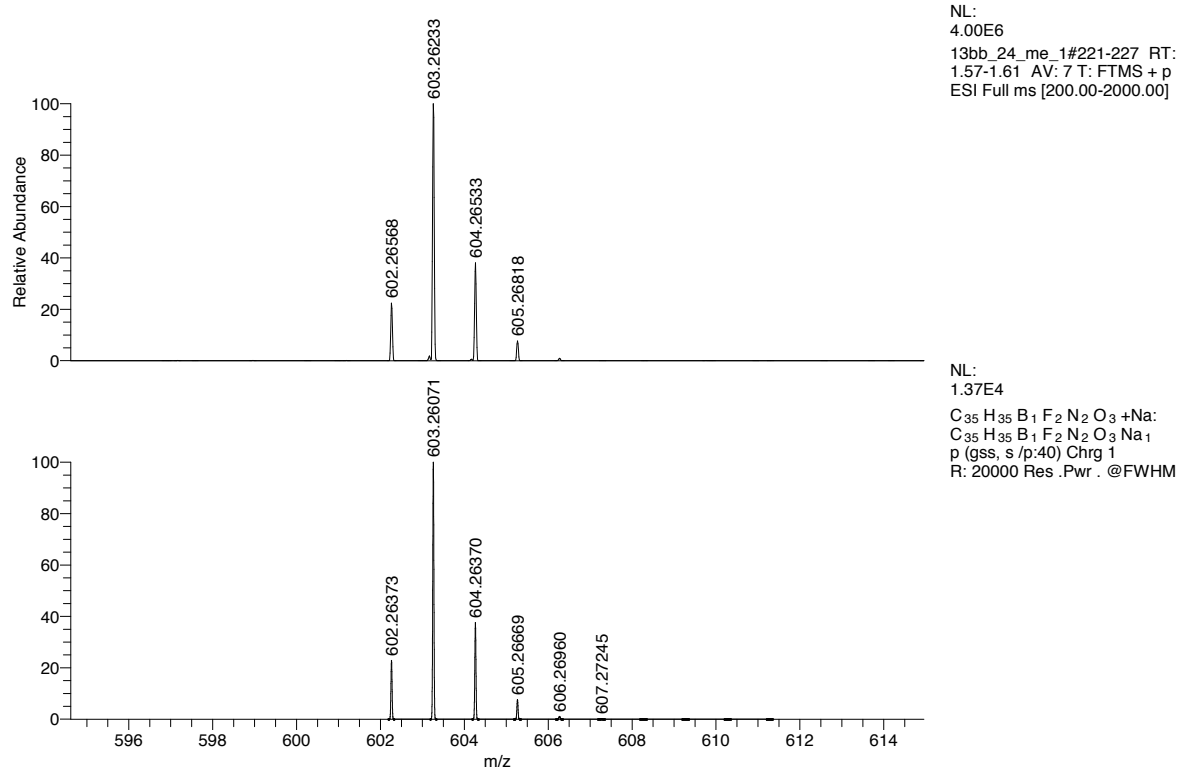
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-2000.00]



C:\Xcalibur\data\13bb_24_me_1

7/12/2013 2:50:58 PM

13bb_24_me

**Figure S22.** HRMS (ESI) mass spectra of **7** (up = experimental, down = theoretical)

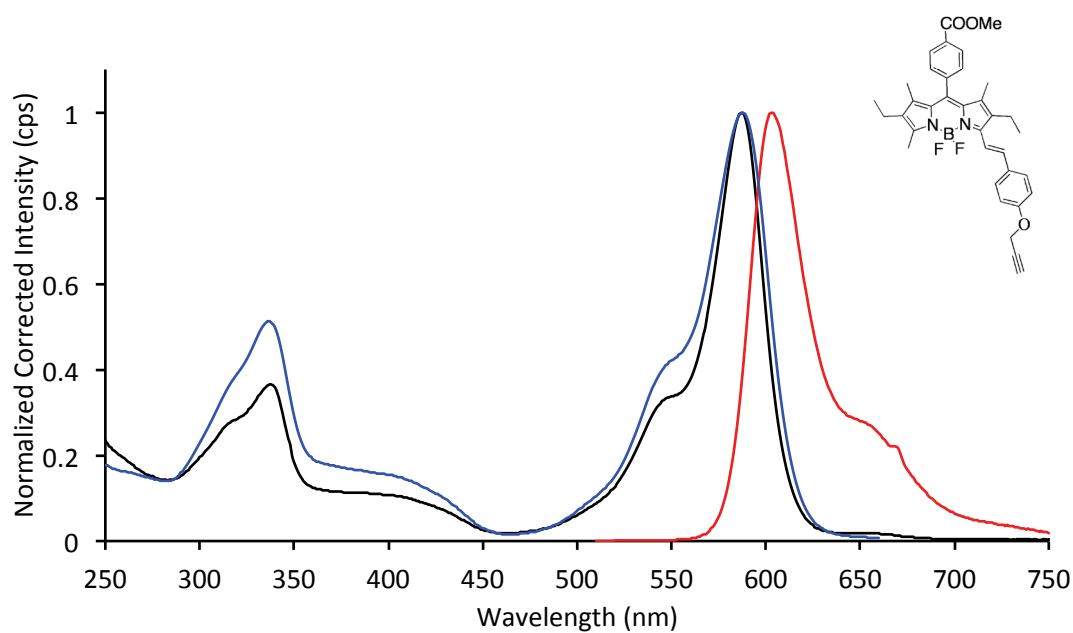


Figure S23. Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 510$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 670$ nm) spectra of **7** in 2-MeTHF at room temperature.

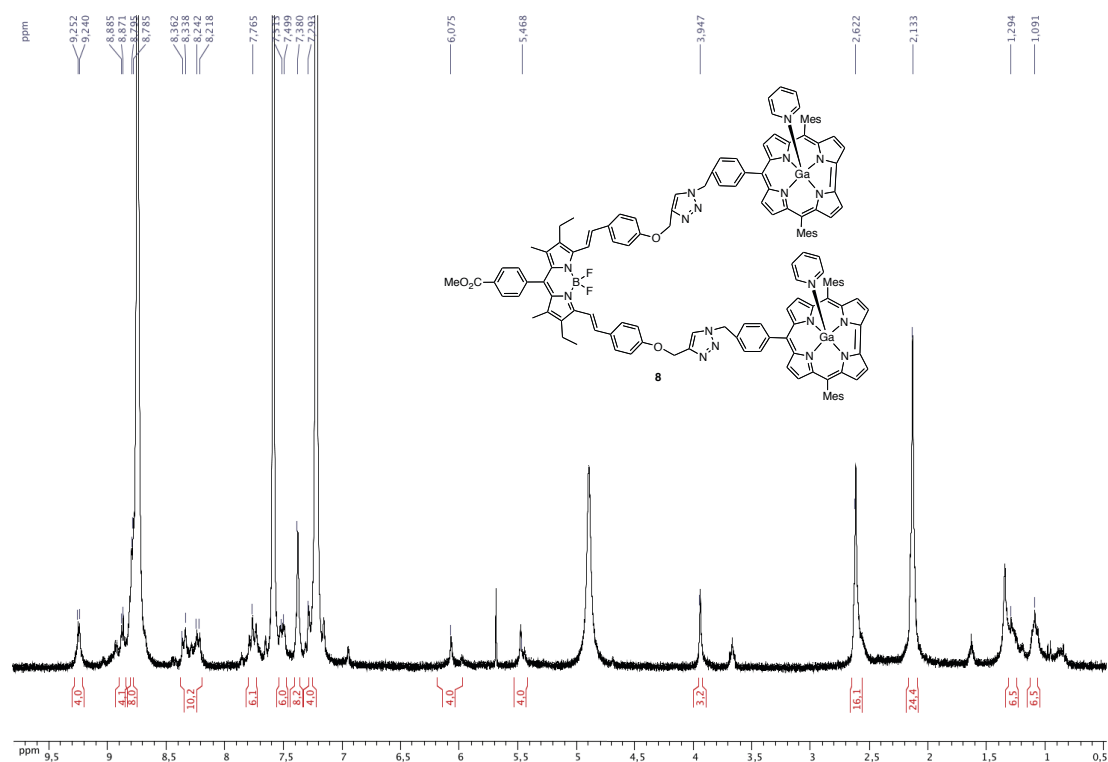


Figure S24. ^1H NMR spectrum of **8** (pyridine D5, 300 MHz, 298 K)

D:\DATA\SLIMRES\13adu_012_aprespurif_01022013pm0_2\2

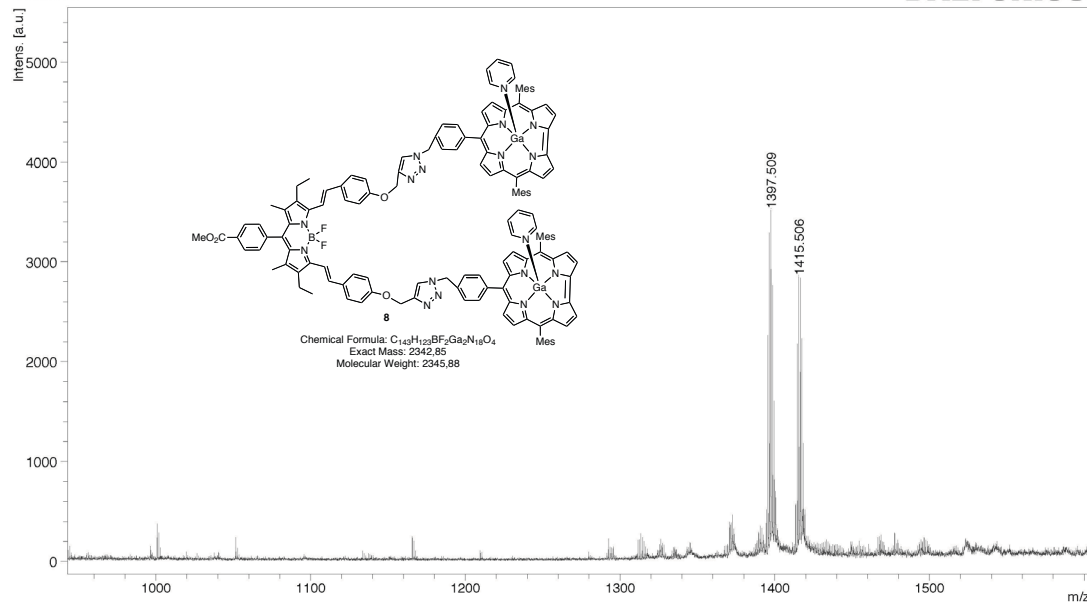
Bruker Daltonics flexAnalysis on Ultraflex II for J.M. Barbe

printed: 3/12/2013 3:32:55 PM

**BRUKER
DALTONICS®**

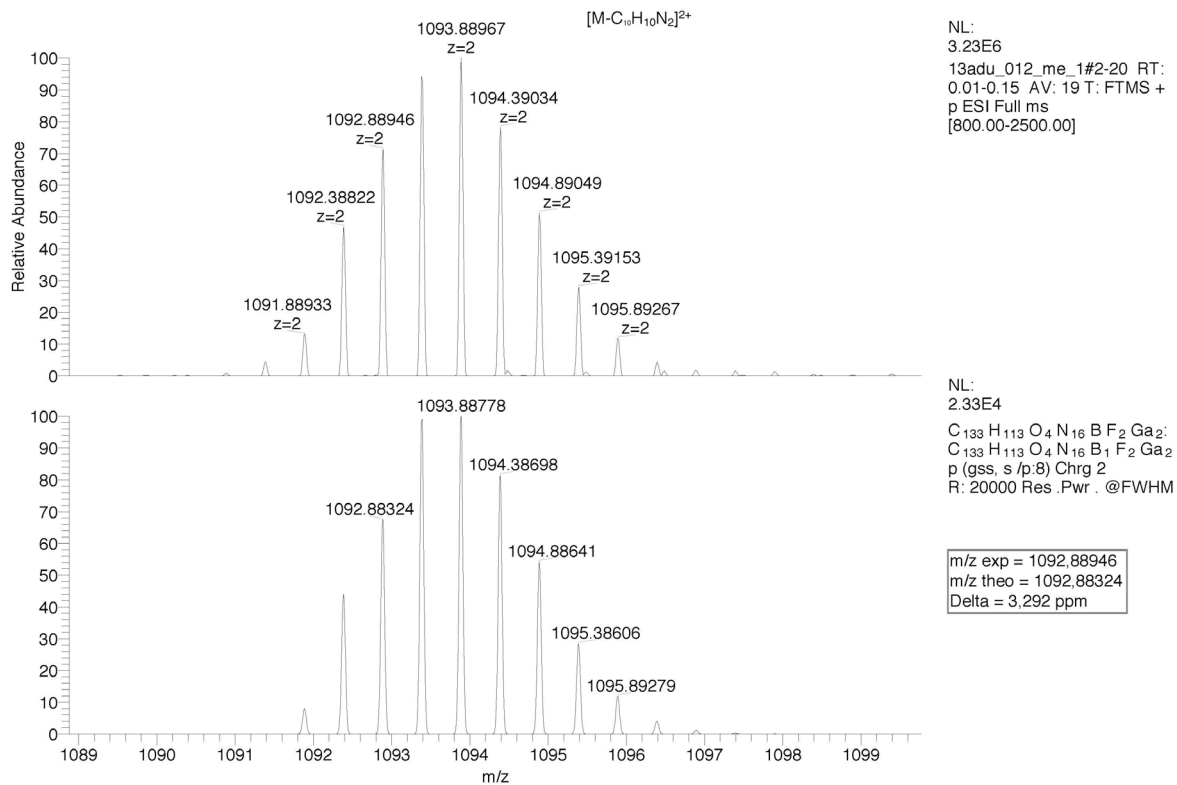
Comment 1

Comment 2

C:\Xcalibur\data\13adu_012_me_1
H2O/MeOH

2/8/2013 11:57:00 AM

13adu_012_me

Figure S25. MALDI/TOF mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **8**

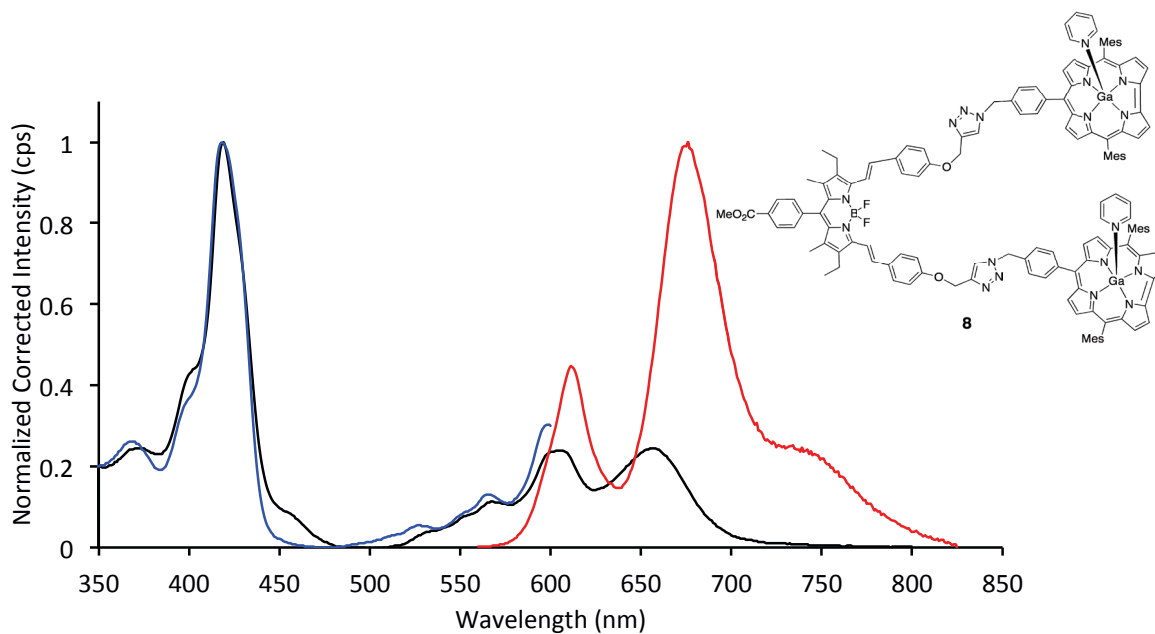


Figure S26. Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}} = 670$ nm) spectra of **8** in 2-MeTHF at room temperature.

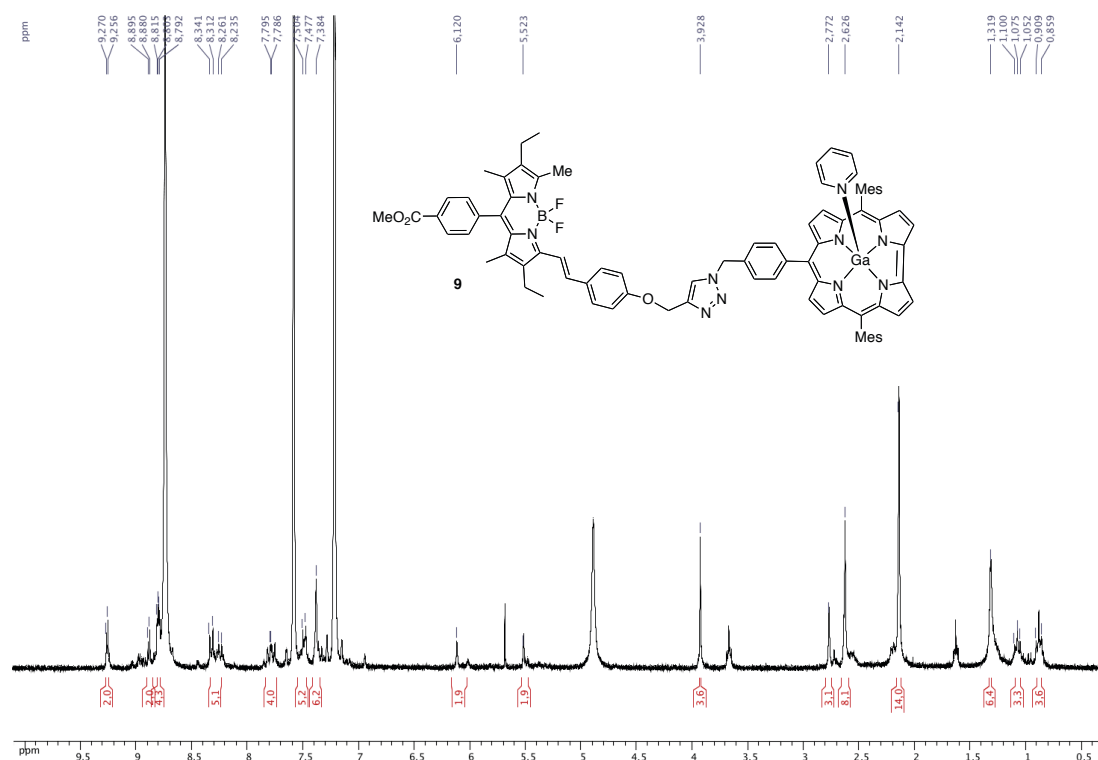


Figure S27. ^1H NMR spectrum of **9** (pyridine D₅, 300 MHz, 298 K)

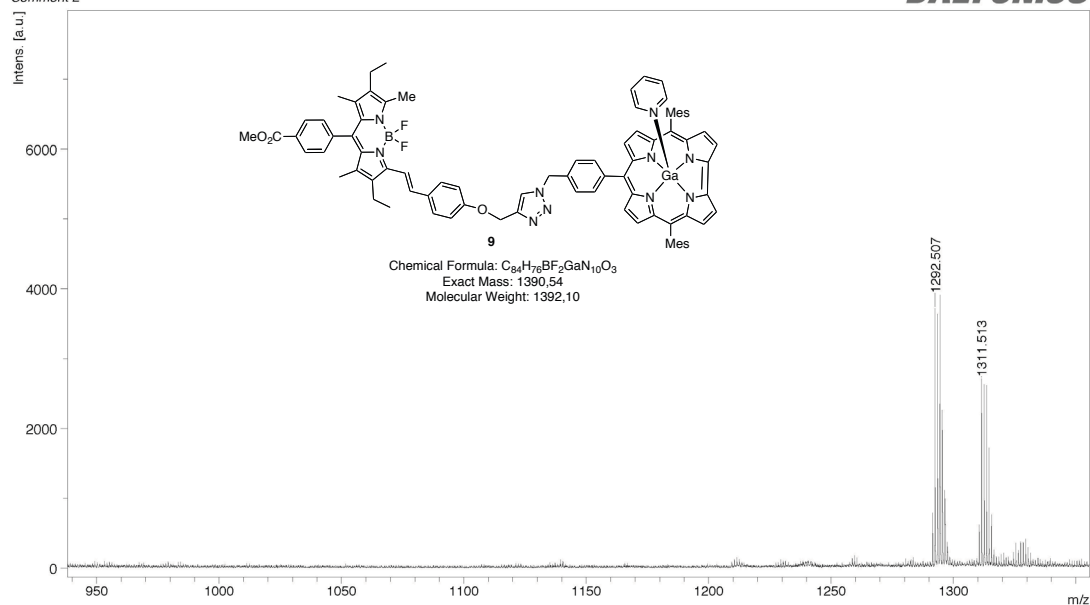
D:\DATA\SLIMRES\12nd_176b_10072012pm0_22

Bruker Daltonics flexAnalysis on Ultraflex II for J.M. Barbe

Comment 1

Comment 2

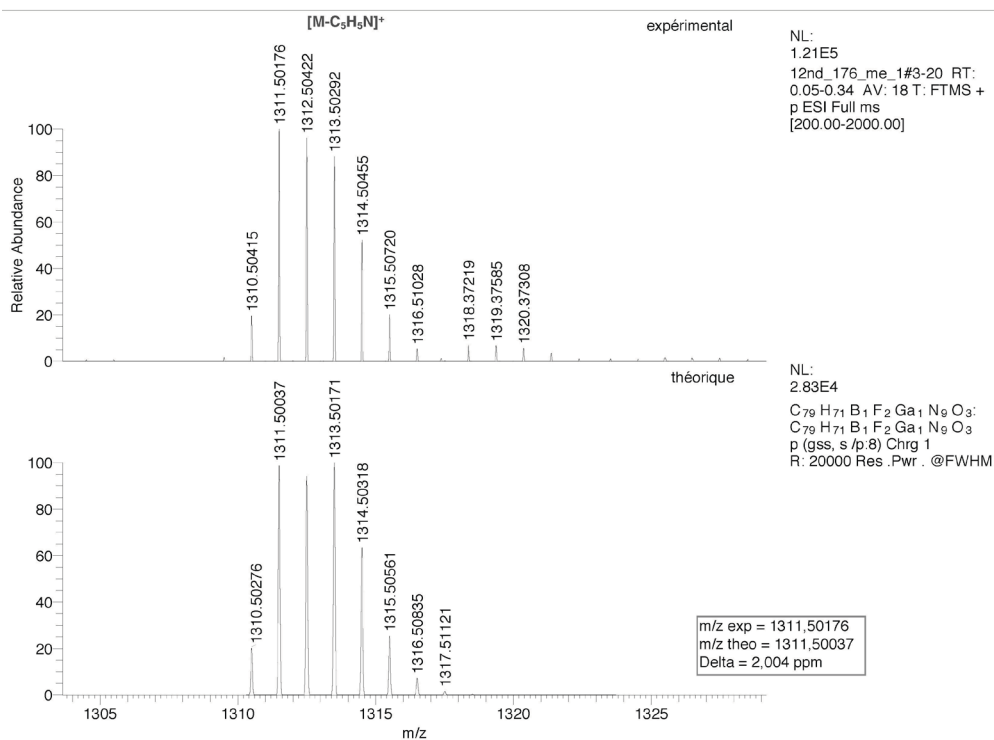
printed: 3/12/2013 3:21:05 PM

**BRUKER
DALTONICS®**

C:\xcalibur\data\12nd_176_me_1

7/13/2012 1:44:40 PM

12nd_176_me

Figure S28. MALDI/TOF mass spectra and HRMS (ESI) mass spectra of **9**

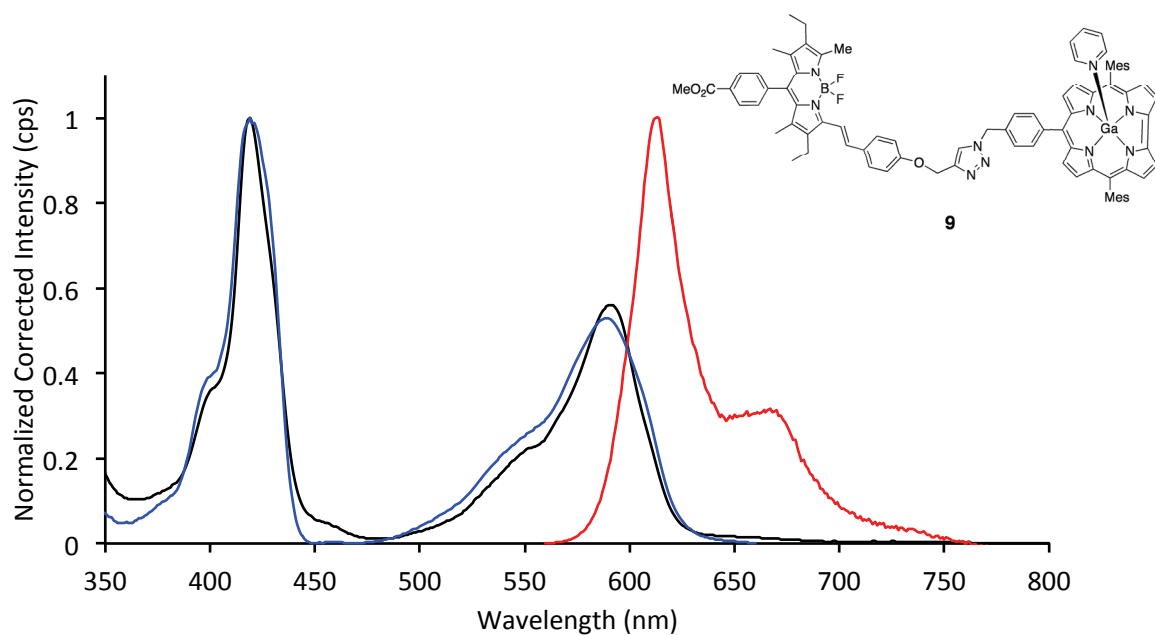


Figure S29. Absorption (black), fluorescence (red, $\lambda_{\text{ex}}=510$ nm) and excitation (blue, $\lambda_{\text{em}}=670$ nm) spectra of **9** in 2-MeTHF at room temperature

COMMUNICATIONS

■ Orale

Bertrand Brizet, Claire Bernhard, Christine Goze, Pierre D. Harvey, Franck Denat.

*"Synthèse et Étude de Nouveaux Précurseurs
pour l'imagerie bimodale optique/SPECT-TEP"*

XIV^{èmes} journées des Ecoles Doctorales Pasteur et Carnot, Dijon, mai 2013.

Prix SCF, Section Régionale Bourgogne/Franche Comté

■ Par poster

Bertrand Brizet, Claire Bernhard, Christine Goze, Pierre D. Harvey, Franck Denat.

*"Élaboration de Nouveaux Précurseurs pour la Détection des Tumeurs
Synthèse et Étude d'un Agent de Contraste Bimodal Optique/Nucléaire"*

5^{ème} Colloque annuel du CQMF, Trois-Rivières, novembre 2012.

■ Séminaires pédagogiques

Séminaire II

"Luminophore AIE Photostable pour le ciblage et l'Imagerie des Mitochondries"

Université de Sherbrooke, février 2013.

Séminaire III

*"Luminophores AIE comme Systèmes on/off pour l'Imagerie par Fluorescence
Intraopératoire"*

Université de Sherbrooke, avril 2013.

PUBLICATIONS

- 1) *DMAP-BODIPYs alkynes: a convenient tool for labelling biomolecules for bimodal PET-optical imaging*, B. Brizet, V. Goncalves, C. Bernhard, Y. Rousselin, P. D. Harvey, F. Denat, C. Goze, *submitted in Chem. Eur. J.*, **2014**. (Article II)
- 2) *Slow and fast singlet energy transfers in BODIPY-gallium(III)corrole dyads linked by flexible chains*, B. Brizet, N. Desbois, A. Bonnot, A. Langlois, A. Dubois, J. M. Barbe, C. P. Gros, C. Goze, F. Denat, P. D. Harvey, *Inorg. Chem*, **2014**, 53, 3392-3403. (Article IV)
- 3) *High Yield SNAr on 8-Halogenophenyl-BODIPY with Cyclic and Acyclic Polyamines*, Y. Volkova, B. Brizet, P. D. Harvey, F. Denat, C. Goze, *Eur. J. Org. Chem.*, **2014**, 2268-2274.
- 4) *Origin of the Temperature Dependence of the Rate of Singlet Energy Transfer in a Three-Component Truxene-Bridged Dyads*, A. Langlois, H-J. Xu, B. Brizet, F. Denat, J-M. Barbe, C. P. Gros, P. D. Harvey, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2014**, 18, 94-106.
- 5) *Boron Functionalization of BODIPY by Various Alcohols and Phenols*, B. Brizet, C. Bernhard, Y. Volkova, Y. Rousselin, P. D. Harvey, C. Goze, F. Denat, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, 11, 7729-7737. (Article I)
- 6) *BODIPY Dyes Functionnalized with Pendant Cyclic and Acyclic Polyamines*, Y. Volkova, B. Brizet, P. D. Harvey, A. D. Averin, C. Goze, F. Denat, *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 4270-4279.
- 7) *B,B-Diporphyrinbenzyloxy-BODIPY Dyes: Synthesis and Antenna Effect*, B. Brizet, A. Eggenpillier, C. P. Gros, J-M. Barbe, C. Goze, F. Denat, P. D. Harvey, *J. Org. Chem.*, **2012**, 77, 3646-3650. (Article III)